

**UNIVERSIDAD SAN PABLO CEU**

**Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud**

**Departamento de Ciencias Químicas**



**TESIS DOCTORAL**

**INFLUENCIA DE CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS  
GRASOS DE LA DIETA, LA GESTACIÓN Y LA DIABETES EN LOS  
NIVELES TISULARES Y CIRCULANTES DE VITAMINA E EN LA RATA**

Memoria que para optar al grado de Doctor por la  
Universidad San Pablo CEU presenta:

**FRANCISCO JAVIER RUPÉREZ PASCUALENA**

Directores:

**Coral Barbas Arribas  
Emilio Herrera Castellón**

Madrid, 2003

ayer, hoy, siempre  
a Maite, Tote, Pablo  
a Marta

*“El progreso (...) fue alimentado por la competencia entre las diversas perspectivas y técnicas (...). El interjuego (...) ha enriquecido mucho nuestra comprensión de la naturaleza de la vida y creado materiales para una literatura más poderosa que cualquier fantasía de la cultura precientífica”*

Edward O. Wilson  
*Sobre la Naturaleza Humana*

*“The beauty of Nature lies in detail; the message in generality.  
Optimal appreciation demands both”*

Stephen Jay Gould  
*Wonderful Life*

*“...ahora están brillando las estrellas con todo su esplendor, y los videntes gozan de la maravilla de su presencia. Esos mundos lejanísimos están ahí tras los cristales, al alcance de nuestra vista...  
¡si la tuviéramos!”*

Antonio Buero Vallejo  
*En la Ardiente Oscuridad*



Ilustraciones:

Introducción:	R. Magritte, <i>La memoria IV</i>
Objetivos:	M.C. Escher, <i>Serpientes</i>
Materiales y Métodos:	J. Vermeer, <i>La hilandera</i>
Resultados:	R. Magritte, <i>El espejo falso</i>
Discusión:	M.C. Escher, <i>Casa de escaleras</i>
Conclusiones:	R. Magritte, <i>La cuerda sensible</i>
Bibliografía:	M.C. Escher, <i>Naturaleza muerta con calle</i>
Protocolos Experimentales:	R. Magritte, <i>El autómata</i>
Publicaciones:	J. Vermeer, <i>Vista de Delft</i>

# AGRADECIMIENTOS

*Llegado este punto en que por fin veo terminado el proyecto que inicié hace casi siete años, siento que debo agradecer de corazón muchas cosas, pues a lo largo de todo el tiempo que he tardado en completarlo he encontrado personas dispuestas a ayudarme. Me siento afortunado, porque he encontrado asistencia técnica y apoyo personal cuando los he precisado, pero también muchas veces auxilio inesperado, y a menudo he recibido consuelo en personas que quizá no se dieron cuenta de lo importante que fue para mí algo tan sencillo como su presencia, una palabra de ánimo, o una palmada en el hombro. Siento al llegar a este punto que sin su "estar ahí", todo mi esfuerzo habría sido en vano, pues no sé si habría podido culminar en la presente Tesis. No es fácil dejar por escrito mi agradecimiento a todos y cada uno de los que en algún momento me han ayudado, pero quiero intentarlo.*

*Es de justicia que, ante todo, agradezca el haber podido dar término a este proyecto, no a una persona, sino a una institución, la Fundación Universitaria San Pablo C.E.U. En la formación Humanista que preconiza, también hay espacio y medios para la investigación científica que desarrollamos en nuestra Facultad, y yo además he sido honrado con una beca que me ha permitido llevar a cabo los experimentos necesarios para mi Tesis.*

*Pero si a alguien sobre todo debo el haber concluido este trabajo es a mi Directora, Coral Barbas, pues sin ella nada habría empezado. Tengo que agradecerle gran cantidad de cosas (detalles puntuales y actitudes globales) que se me amontonan en la mente en este momento, y hay demasiado como para intentar resumirlo todo en unas pocas palabras. He aprendido mucho a su sombra (y no sólo Química), pues sabe y disfruta enseñando. Pero por lo que toda la vida le estaré agradecido es por haberme demostrado que es alguien por quien merece la pena practicar la lealtad, que no tiene nada que ver con el servilismo. Semper fidelis.*

*De mi Director, Emilio Herrera, le agradecí y le sigo agradeciendo que día a día me haya demostrado que el gran científico que es no ha perdido un ápice de calidad humana. Me enorgullezco de haber disfrutado del honor de que mi trabajo haya sido dirigido, corregido, alentado, estimulado... por alguien como él, y que siempre me haya hecho sentir que en él tenía un magister con quien podía contar para solucionar mis dudas. En mi Curriculum siempre consideraré como título propio de esta Universidad el de "Trabajo dirigido por el Profesor E. Herrera". Mención aparte merece la satisfacción y alegría que siento por haber podido compartir con tan gran Bioquímico algunos memorables momentos no sólo científicos ("...por el arco de La Macarena...").*

*El trabajo con ratas que aquí presento ha sido compartido en gran medida por la Dra. E. Amusquívar, Caní, a quien esta Tesis (yo, en suma) le debe mucho. Tengo que agradecer, primero, lo que significa poder sacar conclusiones de un trabajo bien hecho, y lo mucho que he aprendido a su lado, acerca de la dedicación, el cuidado y la responsabilidad que implican el trabajar con animales experimentales. Pero compartir ratas supone también llegar a conocer a tu compañer@ (aunque a veces se resista), y es justo agradecer también muchas cosas a nivel personal. A menudo dice más que un gran discurso una sola palabra, o una ceja levantada, para el que hace un esfuerzo por escuchar, pues en realidad no hace falta decir aquello que ya sabe quien tiene que saberlo.*

*Cuando pienso en el tiempo de laboratorio me felicito por la suerte que he tenido, pues en los dos laboratorios en los que he llevado a cabo mi trabajo he aprendido muchísimo, y he disfrutado de buenos momentos que recordaré siempre. Todo empezó en el laboratorio de Bioquímica, junto a Sonia (Sónica), aunque más justo sería decir que tras sus pasos (y tras sus seudorefranes, sus coplas, sus carcajadas...), y creo sinceramente que cualquier laboratorio es mejor cuando cuenta con alguien como ella. Desde esos principios, en todo momento he podido contar con alguien como Mila, "la jefa", a quien nada de lo que pasa por allí se le escapa, y de cuya sabiduría he podido aprovecharme, pues siempre ha estado dispuesta a escuchar y orientar a un pesado como yo en el proceloso mundo de las probetas y tampones. Pero a todo el equipo de Bioquímica debo agradecer muchas cosas, en grupo e individualmente, pues siempre he encontrado la ayuda de gente que, aunque intermitentemente, ha estado allí desde el inicio. De quien podía estar más relacionado con mi trabajo, como Marta y Paola, a quienes he dado muchas palizas preguntando sobre vitamina E, el estrés oxidativo, la diabetes, HPLC... y siempre me han tratado maravillosamente, pero, aunque las líneas de investigación no hayan sido tan coincidentes, también debo agradecer a Maribel todo lo que he aprendido de ella, en lo que la he preguntado y en lo que la he escuchado; a Marian, porque su manera de entender la ciencia y la docencia ha sido también importante en mi evolución personal; a Iliana, su solidaridad, su sonrisa, su tranquilidad, y su mirada limpia, pues siempre es un placer hablar con alguien que escucha como ella. Gracias también a María del Henar Ortega Senovilla (espero haberlo escrito bien ;-P), porque en los últimos tiempos me ha demostrado que es una persona en quien se puede confiar, alguien a quien merece la pena escuchar, además de ser una referencia profesional muy clara para mí.*

Gracias al laboratorio de Bioquímica he podido conocer a gente que ha sido muy importante en este trabajo, no sólo en la investigación en sí, sino también por la buena disposición con la que me han tratado siempre, como Judith, a quien debo agradecer su trabajo con las ratas, que se convirtió en el inicio del mío; Pilar, cuya experiencia en el campo del estrés oxidativo ha sido una fuente de información muy valiosa para mí, no sólo por lo que sabe (que es mucho), sino porque siempre que la he consultado me ha atendido con una sonrisa; Mario, al que considero como el origen de todo, y que sé que siempre ha estado pendiente de mis progresos. Gracias también a los otros profesores del área de Bioquímica que también han aportado a mi formación, como Estrella y Antonio, a quienes en un principio "okupé" su sitio en el laboratorio; a Bartolo, cuyo agudo sentido crítico ha sido siempre un acicate para que estuviera siempre seguro de lo que yo pudiera afirmar; a Carlos, con quien quizá he compartido más "íntimos" momentos y con quien siempre he podido contar para consultar mis dudas, y a Pilar López-Luna, que me ha demostrado que, aunque se llegue a saber tanto como ella, la formación no termina nunca. No quiero dejar de nombrar aquí a alguien como Ana Soria, de quien, aunque sabe de ciencia mucho más que yo, las lecciones que de ella he aprendido versan acerca de la vida y cómo hay que saber vivirla siempre con una sonrisa en los labios y procurando hacer siempre más agradable la vida a los demás. Además, he tenido también la fortuna de poder aprender un tratamiento de ratas tan delicado como el necesario para obtener una muestra de su leche en el laboratorio del Dr. Juan Viña, y quiero agradecerle a él y a su equipo todas las facilidades que nos proporcionaron.

La mayor parte del tiempo experimental la he pasado dentro de la Sección de Química Analítica. Para bien o para mal, soy Biólogo en un laboratorio de esta disciplina, y tengo que agradecer a todas las integrantes del equipo que me hayan aceptado y ayudado para superar mis carencias, sobre todo en las clases de las asignaturas que he impartido, es decir, el trabajo que me ha permitido obtener la beca de la que he disfrutado: a las profesoras de la Sección, Mari Paz Martínez, Nines y Mari Paz Lorenzo, a Dolores, a quien además tengo que agradecer muchos buenos ratos pasados en su "refugio", sin olvidar a Gloria y a Mila, y, especialmente, a Asun, pues sin sus conocimientos de la Electroquímica no habría podido obtener los productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol. A todas ellas, gracias por hacerme creer que yo también podía aportar algo a la Sección. En "primera línea de batalla" he disfrutado trabajando al lado de los que han ido pasando por el laboratorio, y gracias a los que he aprendido tanto o más de lo que han podido aprender ellos: todos los que han realizado su trabajo de licenciatura, sobre todo a Marian y Patricia, que me han obligado a profundizar mucho más en mis conocimientos para poder transmitirlos bien; gracias a Teresa, Arancha, Elena, Eva, Laura y Helena, que se iniciaron en la investigación conmigo y con quienes he compartido muchas vivencias que no olvido, pero que han decidido que su búsqueda de la felicidad les llevaba por otro camino profesional, como también Diego, que me enseña que ser amigos no se basa en estar de acuerdo en todo, y Enrique, que me ofrece su amistad diariamente sin esperar contrapartida. También volvió a su casa Maarit, a quien tengo que agradecer estar siempre tan cerca de nosotros, aunque se encuentre lejos. Otras se han incorporado más recientemente y, aunque no han participado conmigo en los agobios de la fase experimental, han soportado mis malos momentos en la última fase de escritura, y eso también ha sido muy importante para mí. Gracias a Nuria, Beatriz, Bea, Vanesa y Zulheika, por su solidaridad, interés y comprensión, y especialmente a Diana, que ha tenido que soportar más de cerca mis agobios. Y están también los veteranos, que me han aguantado (sostenido) desde el principio hasta el final, que tienen gran parte de "culpa" en que yo pueda decir que para mí venir a trabajar nunca ha sido traumático, porque siempre me lo he pasado bien con ellos: gracias a Verónica, pues aunque cambiemos (y ambos hemos cambiado mucho) siempre me ha hecho sentir que me ha mantenido el respeto y el cariño (y es recíproco), aunque no comparta lo que pienso y lo que siento. A Luis, querido Istari, gracias porque ser alguien a quien se pueden confiar responsabilidades, y por haber compartido conmigo varias aficiones y la incompreensión de los que nos rodean acerca de ellas. A Toñi, gracias, porque me demuestra cada día lo importante que es hacer las cosas con ilusión, porque regala su alegría sin pedir nada a cambio, porque hace más fácil la vida a todos ya que por todos se preocupa e interesa, y por demostrarme que no es tan difícil ser amigos a pesar de ser compañeros de trabajo (y por pipetear mejor que nadie).

Nuestra Facultad quizá no es muy grande, pero eso para mí ha supuesto una ventaja, ya que me ha permitido aprovecharme de los conocimientos y material de secciones y laboratorios muy diversos. Además, debo hacer hincapié en la buena disposición que he encontrado para ayudarme allí donde he ido a pedir. Los vecinos en una casa se prestan una tacita de sal, yo he tenido muy buenos vecinos en Microbiología que me han prestado una microfuga hasta tener la nuestra, en Química Orgánica reactivos "raros", en Nutrición, Fisiología o Biología Vegetal ese material de HPLC que uno descubre (justo antes de ponerse a trabajar) que falta, en Parasitología aceite de parafina; o que me han permitido usar sus equipos, como el lector de placas de Bioquímica Clínica o incluso su propia mesa de despacho (gracias, Raquel). Muy valiosa ha sido para mí la oportunidad de poder consultar dudas específicas en Matemáticas, y la introducción a las unidades "probit" se la debo a Paco (además de muchos y buenos ratos y consejos) y a Nuno. Pero en la Facultad además he podido encontrar gente que por los pasillos, o en la cafetería, o en cualquier sitio, me han mostrado interés y sensibilidad hacia mis problemas, y me han ofrecido su apoyo desinteresadamente. Gracias a Agustín, Alfredo, Ana, Anuska, Candi, Carmi-na, Cristina, Elena, Elia, Eva, Fernando, Gema, Inma, Isabel, Jose, Kiko, Lucas, Loli, María, Marisa, Mariví, Maxi, Noelia, Nuria, Nuria, Tete, Paloma, Peter, Raimundo, Santiago, Raquel, Ricardo... porque son como son aunque su forma de ser no esté suficientemente valorada.

*Hay mucha gente que ha sido importante en esta Tesis porque han llevado a cabo bien el trabajo que tienen asignado, lo cual ha sido imprescindible para poder realizar el mío. En este sentido, para mí ha sido vital el Servicio de Animalario, sin cuya organización y seriedad no podría tener ninguna seguridad acerca de mis resultados. Pero a José María, Jesús e Inma, y también a Carlitos, no les aprecio sólo por buenos profesionales. Ha habido muchas ocasiones en las que me han demostrado la buena pasta de la que están hechos, y su preocupación por la evolución de mis experimentos ha ido más allá de la mera profesionalidad. Lo mismo tengo que agradecerle a Juanjo Gragera (Sr.), pues cuando yo empecé, para mí las siglas HPLC no significaban nada, y una de las personas a quienes más conocimiento sobre la técnica y entresijos de los equipos debo es a él. Que sepa reparar equipos es su trabajo, pero no lo es ser lo solícito y atento que ha sido siempre que he tenido problemas o dudas.*

*El Servicio de Limpieza de la Facultad siempre ha estado al pie del cañón, junto con el interés que me han demostrado por algo que no sabían lo que era pero que entendían que era importante para mí. Gracias a Julia, Mila y María, sin olvidar a Rosa, Nieves, Pilar, Herminia, María Jesús, Eva, etc. Ese mismo interés personal lo tengo que agradecer al Servicio de Seguridad, a Juan e Iván, a Domingo, Fermín y Pablo y a todos los demás que me han abierto puertas (en el sentido más literal) en muchas ocasiones. También agradezco a Bedeles, Administrativos y Servicio de Mantenimiento, junto con la buena gente de Cafetería y Comedor su buen hacer para que todo en la Facultad marche sobre ruedas y especialmente a Miguel Ángel, Enrique, Alejandro y Carlos, porque me han hecho favores a los que no les obligaba su contrato. Gracias también a Guillermo, porque además de resolvernos problemas de material, me hace acordarme de quién soy y de dónde vengo.*

*El apoyo más inconcreto, pero al mismo tiempo más incondicional y constante lo he recibido de mis amigos y mi familia (en el fondo, casi la misma cosa). El agradecimiento que yo siento no es, entonces, por nada concreto, pero es profundo y sincero. A Enrique, gracias, porque además del apoyo intangible, sin su portátil todo me habría resultado más complicado. Entre todos ellos, ¿cómo podría olvidar todo lo que por mí han hecho mis padres y mi hermano? El apoyo silencioso y generoso, los pequeños detalles y la seguridad que me ha dado saber que podía contar con ellos, con su corazón y con su brazo, para escuchar y ayudar. Les debo mucho más que esta Tesis, y por eso viajan en mis pensamientos y mis sentimientos.*

*“Yo no digo mi canción sino a quien conmigo va”, pero más mérito tiene si quien hace el camino conmigo no está interesado en mi canción pero se la aprende y hace suya por amor. Gracias, Marta, porque tu sonrisa levanta mi ánimo en momentos de depresión, porque tu tranquilidad serena mi alma en etapas de desasosiego, por haberme esperado cuando no llegaba porque me faltaba el aliento. Gracias por ser y por estar.*

*Toda senda vital se enriquece con aquéllos con los que caminas. Es duro cuando alguien que quieres se queda en una curva o en un repecho y es la propia vida la que no nos deja pararnos y nos obliga a dejarlos atrás, pero nos quedan los recuerdos, y si los recuerdos de vida existen, ellos viven en nuestros recuerdos. A Manuel, a Concha, gracias, porque os llevo conmigo.*

*A todos ellos, GRACIAS.*

Javier

Madrid, 2003

---

*“Where shall we lair today?  
For, from now, we follow new trails.”*

Rudyard Kipling  
*The Jungle Books*

# INDICE

INDICE.....	I
<b>FIGURAS Y CUADROS .....</b>	<b>V</b>
<b>FIGURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>CUADROS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>SIGLAS Y ABREVIATURAS EMPLEADAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Historia de la Vitamina E</i> .....	3
1.2 <i>Funciones de la Vitamina E</i> .....	6
1.2.1 Funciones no antioxidantes de la vitamina E.....	7
1.2.2 Funciones antioxidantes: Vitamina E y radicales libres.....	9
1.2.2.1 Estrés oxidativo y peroxidación lipídica.....	9
1.2.2.1.1 Proceso de peroxidación lipídica.....	12
1.2.2.2 Propiedades antioxidantes de la Vitamina E.....	13
1.2.2.3 Actividad prooxidante del $\alpha$ -tocoferol.....	15
1.3 <i>Metabolismo de la Vitamina E</i> .....	16
1.3.1 Absorción intestinal y transporte.....	16
1.3.2 Incorporación a VLDL: $\alpha$ -TTP.....	18
1.3.3 Captación tisular de vitamina E.....	20
1.3.4 Vitamina E y lípidos de la dieta.....	22
1.3.4.1 Peroxidación lipídica asociada a la dieta.....	22
1.3.5 Lípidos, estrés oxidativo y vitamina E al final de la gestación, en el feto y el recién nacido.....	23
1.3.5.1 Metabolismo lipídico en la gestación.....	23
1.3.5.2 Estrés oxidativo en la gestación.....	25
1.3.5.3 Lípidos en la dieta durante la etapa perinatal.....	25
1.3.5.4 Vitamina E en la gestante, el feto y el recién nacido.....	27
1.3.6 Lípidos, estrés oxidativo y vitamina E en la IDDM.....	28
1.3.6.1 Metabolismo lipídico en la IDDM.....	28
1.3.6.2 Estrés oxidativo en la IDDM.....	30
1.3.6.3 Lípidos en la dieta de diabéticos tipo I.....	31
1.3.6.4 Vitamina E en la IDDM.....	31
1.4 <i>Métodos de valoración de Vitamina E y productos relacionados</i> .....	32
1.4.1 Tratamiento de la muestra.....	32
1.4.2 HPLC.....	34
1.4.2.1 HPLC en fase normal.....	34
1.4.2.2 HPLC en fase inversa.....	35
1.4.2.3 Detectores.....	35
1.4.3 Valoración de vitamina E en tejido adiposo y glándula mamaria.....	36
1.4.4 Valoración de vitamina E en aceites.....	38
1.4.5 Valoración de vitamina E en dietas.....	39
1.4.6 Valoración de vitamina E y productos relacionados en sangre.....	40
1.5 <i>Validación de métodos analíticos</i> .....	41
1.5.1 Generalidades.....	41
1.5.2 Linealidad y Rango.....	42
1.5.3 Exactitud.....	45
1.5.4 Precisión.....	46
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
3.1 <i>Animales experimentales</i> .....	55
3.1.1 Condiciones generales de estabulación.....	55
3.1.2 Métodos de tratamiento de los animales.....	55
3.1.2.1 Gestación y Lactancia.....	55
3.1.2.2 Desarrollo postnatal.....	56
3.1.2.3 Estimación de la producción de leche.....	56

3.1.2.4	Obtención de leche.....	57
3.1.2.5	Diabetes .....	57
3.1.2.6	Obtención de tejidos y sacrificio .....	57
3.2	<i>Dietas experimentales</i> .....	58
3.3	<i>Diseños experimentales</i> .....	60
3.3.1	Experimento 1: Ingesta durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa .....	60
3.3.2	Experimento 2: Ingesta de dietas con aceite de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia....	61
3.3.3	Experimento 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas con aceite de oliva, pescado o pescado suplementadas.....	63
3.3.4	Experimento 4: Intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes .....	64
3.3.5	Experimento 5: Destino de la vitamina E en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E. ....	66
3.4	<i>Métodos Analíticos</i> .....	68
3.4.1	Instrumentación .....	68
3.4.1.1	HPLC.....	68
3.4.1.2	Otros Equipos.....	68
3.4.1.3	Reactivos.....	69
3.4.2	Determinaciones de vitamina E y productos relacionados.....	69
3.4.2.1	Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol en plasma, hígado, placenta, cerebro, leche, tejido adiposo y glándula mamaria de rata y dietas experimentales.....	69
3.4.2.1.1	Obtención de disolución para extracción .....	70
3.4.2.1.1.1	Muestras.....	70
3.4.2.1.1.2	Patrones .....	70
3.4.2.1.2	Extracción- evaporación-resuspensión .....	71
3.4.2.1.3	Condiciones cromatográficas.....	72
3.4.2.2	Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol en aceite.....	72
3.4.2.3	Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol, $\alpha$ -tocoferol quinona y $\alpha$ -tocoferol hidroquinona en sangre total. ....	73
3.4.2.3.1	Síntesis de $\alpha$ -tocoferol quinona a partir de $\alpha$ -tocoferol.....	73
3.4.2.3.2	Síntesis de $\alpha$ -tocoferol hidroquinona a partir de $\alpha$ -tocoferol quinona.....	73
3.4.2.4	Análisis de $\alpha$ -tocoferol, $\alpha$ -tocoferol quinona y $\alpha$ -tocoferol hidroquinona .....	73
3.4.2.4.1	Disoluciones previas .....	73
3.4.2.4.1.1	Muestras.....	74
3.4.2.4.1.2	Patrones .....	74
3.4.2.4.1.3	Procesamiento de patrones y muestras .....	75
3.4.2.4.1.4	Cromatografía.....	75
3.4.3	Validaciones.....	75
3.4.3.1	Valoración de vitamina E en tejido adiposo .....	75
3.4.3.1.1	Linealidad de patrones.....	75
3.4.3.1.2	Linealidad de muestras .....	76
3.4.3.1.3	Precisión .....	76
3.4.3.1.4	Exactitud .....	76
3.4.3.2	Valoración de vitamina E en glándula mamaria.....	77
3.4.3.2.1	Linealidad de patrones.....	77
3.4.3.2.2	Linealidad de muestras .....	77
3.4.3.2.3	Precisión .....	77
3.4.3.2.4	Exactitud .....	78
3.4.3.3	Valoración de vitamina E en aceites.....	78
3.4.3.3.1	Linealidad de patrones.....	78
3.4.3.3.2	Linealidad de muestras .....	78
3.4.3.3.3	Precisión .....	79
3.4.3.3.4	Exactitud .....	79
3.4.3.4	Valoración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol) en dietas.....	79
3.4.3.4.1	Linealidad de patrones $\alpha$ -tocoferol.....	79
3.4.3.4.2	Linealidad de patrones acetato $\alpha$ -tocoferol.....	80
3.4.3.4.3	Linealidad de muestras .....	80
3.4.3.4.4	Precisión de $\alpha$ -tocoferol y de acetato de $\alpha$ -tocoferol .....	80
3.4.3.4.5	Exactitud de $\alpha$ -tocoferol .....	81
3.4.3.4.6	Exactitud de acetato de $\alpha$ -tocoferol.....	81
3.4.3.4.7	Estabilidad de la vitamina E en las dietas .....	81
3.4.3.5	Valoración de $\alpha$ -tocoferol en sangre.....	82
3.4.3.5.1	Linealidad de patrones.....	82
3.4.3.5.2	Precisión .....	82
3.4.3.5.3	Exactitud .....	82
3.4.4	Determinaciones complementarias.....	83
3.4.4.1	Triglicéridos en plasma.....	83

3.4.4.2	Colesterol en plasma .....	83
3.4.4.3	Glucosa en plasma .....	83
3.4.4.4	TBARS en plasma .....	83
3.4.4.5	Hidroperóxidos en plasma .....	84
3.4.4.6	Isoprostanos en orina .....	84
3.4.4.7	Creatinina en orina .....	84
3.4.4.8	Determinación de ácidos grasos .....	84
3.4.5	Análisis estadístico .....	85
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>89</b>
4.1	<i>Validaciones de métodos analíticos</i> .....	89
4.1.1	Método para medir $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo .....	89
4.1.1.1	Linealidad de $\alpha$ -tocoferol .....	89
4.1.1.2	Linealidad de muestra .....	89
4.1.1.3	Exactitud .....	91
4.1.1.4	Precisión .....	92
4.1.1.5	Consideraciones finales .....	92
4.1.2	Método para medir $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria .....	92
4.1.2.1	Linealidad de $\alpha$ -tocoferol .....	93
4.1.2.2	Linealidad de muestra .....	94
4.1.2.3	Exactitud .....	95
4.1.2.4	Precisión .....	95
4.1.2.5	Consideraciones finales .....	96
4.1.3	Método para medir $\alpha$ -tocoferol en aceite .....	96
4.1.3.1	Linealidad de $\alpha$ -tocoferol .....	97
4.1.3.2	Linealidad de muestra .....	98
4.1.3.3	Exactitud .....	98
4.1.3.4	Precisión .....	99
4.1.3.5	Consideraciones finales .....	99
4.1.4	Método para medir vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol) en dietas .....	100
4.1.4.1	Linealidad .....	104
4.1.4.1.1	De $\alpha$ -tocoferol .....	104
4.1.4.1.1.1	Fluorescencia .....	104
4.1.4.1.1.2	Absorbancia .....	104
4.1.4.1.2	Linealidad de acetato de $\alpha$ -tocoferol .....	104
4.1.4.2	Linealidad de muestra .....	105
4.1.4.2.1	De $\alpha$ -tocoferol .....	105
4.1.4.2.1.1	Fluorescencia .....	105
4.1.4.2.1.2	Absorbancia .....	105
4.1.4.2.2	De acetato de $\alpha$ -tocoferol .....	106
4.1.4.3	Exactitud .....	106
4.1.4.3.1	De $\alpha$ -tocoferol .....	106
4.1.4.3.1.1	Fluorescencia .....	106
4.1.4.3.1.2	Absorbancia .....	107
4.1.4.3.2	De acetato de $\alpha$ -tocoferol .....	107
4.1.4.4	Precisión .....	107
4.1.4.4.1	De $\alpha$ -tocoferol .....	107
4.1.4.4.1.1	Fluorescencia .....	107
4.1.4.4.1.2	Absorbancia .....	107
4.1.4.5	De acetato de $\alpha$ -tocoferol .....	108
4.1.4.6	Estabilidad en las dietas .....	108
4.1.4.7	Consideraciones finales .....	109
4.1.5	Método para medir $\alpha$ -tocoferol en sangre .....	110
4.1.5.1	Linealidad de $\alpha$ -tocoferol .....	110
4.1.5.2	Exactitud de la recuperación de $\alpha$ -tocoferol .....	112
4.1.5.3	Precisión .....	112
4.1.5.4	Consideraciones finales .....	112
4.2	<i>Experimentos con animales</i> .....	113
4.2.1	Experimento 1: Utilización durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa .....	113
4.2.1.1	Dieta .....	113
4.2.1.2	Parámetros corporales .....	116
4.2.1.3	$\alpha$ -Tocoferol tisular .....	117
4.2.1.3.1	$\alpha$ -Tocoferol en plasma .....	118
4.2.1.3.1.1	Concentración de $\alpha$ -tocoferol en plasma .....	118
4.2.1.3.1.2	Relación de $\alpha$ -tocoferol frente a lípidos totales en plasma .....	120
4.2.1.3.2	$\alpha$ -Tocoferol en hígado .....	123

4.2.1.3.2.1	Concentración de $\alpha$ -tocoferol .....	123
4.2.1.3.2.2	Cantidad de $\alpha$ -tocoferol .....	125
4.2.1.3.3	$\alpha$ -Tocoferol en tejido adiposo lumbar .....	127
4.2.1.3.3.1	Concentración de $\alpha$ -tocoferol .....	127
4.2.1.3.3.2	Cantidad de $\alpha$ -tocoferol .....	129
4.2.1.3.4	$\alpha$ -Tocoferol en placenta .....	131
4.2.1.3.5	$\alpha$ -Tocoferol en hígado fetal .....	133
4.2.1.3.6	Correlaciones .....	135
4.2.2	Experimento 2: Ingesta de dietas con aceite de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia..	136
4.2.2.1	$\alpha$ -Tocoferol en la gestación .....	136
4.2.2.2	Desarrollo tras el nacimiento .....	138
4.2.2.3	$\alpha$ -Tocoferol en la lactancia .....	143
4.2.3	Experimento 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas con aceite de oliva, pescado o pescado suplementadas.....	146
4.2.3.1	Parámetros maternos .....	148
4.2.3.2	Parámetros de desarrollo postnatal .....	150
4.2.3.3	$\alpha$ -Tocoferol en la lactancia .....	155
4.2.4	Experimento 4: Intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes .....	158
4.2.4.1	Parámetros maternos .....	159
4.2.4.1.1	Producción y composición de la leche .....	160
4.2.4.1.2	Parámetros corporales .....	161
4.2.4.2	Desarrollo tras el nacimiento .....	162
4.2.4.3	$\alpha$ -Tocoferol en la lactancia .....	166
4.2.4.3.1	$\alpha$ -Tocoferol en tejidos maternos .....	166
4.2.4.3.2	$\alpha$ -Tocoferol en tejidos de las crías .....	169
4.2.5	Experimento 5: Destino del $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E .....	171
4.2.5.1	$\alpha$ -Tocoferol en las dietas .....	172
4.2.5.2	Ingesta y peso corporal .....	173
4.2.5.3	Parámetros plasmáticos antes y después del ayuno .....	175
4.2.5.4	Otros parámetros de estrés oxidativo .....	182
4.2.5.5	$\alpha$ -Tocoferol tisular .....	183
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>191</b>
5.1	<i>Validación de métodos analíticos .....</i>	<i>191</i>
5.2	<i>Experimentos con animales .....</i>	<i>191</i>
5.2.1	Experimento 1: Utilización durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa .....	191
5.2.1.1	Consideraciones previas .....	191
5.2.1.2	Influencia de la gestación sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol .....	192
5.2.1.3	Influencia del porcentaje de grasa en la dieta sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol .....	194
5.2.1.4	Influencia del tipo de grasa en la dieta sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol .....	196
5.2.1.5	Interacciones entre los distintos factores .....	197
5.2.2	Experimentos 2, 3 y 4: Ingesta durante la gestación y la lactancia de dietas de oliva, pescado o pescado suplementadas, e intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes.....	198
5.2.3	Experimento 5: Destino del $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E .....	204
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>213</b>
6.1	<i>Consideraciones finales.....</i>	<i>215</i>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>219</b>
	<b>APÉNDICE I: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>257</b>



## FIGURAS Y CUADROS

### *Figuras*

<b>Fig. 1:</b> Estructura de los compuestos naturales con actividad de vitamina E .....	4
<b>Fig. 2:</b> Estructura de alguno de los compuestos artificiales con actividad de vitamina E.....	6
<b>Fig. 3:</b> Peroxidación lipídica. ....	12
<b>Fig. 4:</b> Productos de la peroxidación lipídica .....	13
<b>Fig. 5:</b> Cómo detiene el $\alpha$ -tocoferol la peroxidación lipídica.....	14
<b>Fig. 6:</b> Principales productos de oxidación del $\alpha$ -tocoferol.....	15
<b>Fig. 7:</b> Esquema de la absorción y transporte de vitamina E.....	21
<b>Fig. 8:</b> El animalario de la USP-CEU. Celda de cría .....	55
<b>Fig. 9:</b> Diseño Experimental 1: Ingesta durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa .....	61
<b>Fig. 10:</b> Diseño Experimental 2: Ingesta de las dietas de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia .....	62
<b>Fig. 11:</b> Diseño Experimental 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas de oliva, pescado o pescado suplementadas.....	63
<b>Fig. 12:</b> Diseño Experimental 4: Intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes .....	65
<b>Fig. 13:</b> Jaulas Metabólicas .....	66
<b>Fig. 14:</b> Diseño Experimental 5: Destino de la vitamina E en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E .....	67
<b>Fig. 15:</b> Esquema del tratamiento de muestra de los métodos para analizar vitamina E en plasma, hígado, cerebro, placenta, leche, tejido adiposo, glándula mamaria y dietas experimentales .....	70
<b>Fig. 16:</b> Reacción del MDA con el TBA .....	83
<b>Fig. 17:</b> Cromatogramas representativos de patrón y muestras de tejido adiposo.....	90
<b>Fig. 18:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para medir $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo .....	90
<b>Fig. 19:</b> Cromatogramas representativos de patrón y muestras de glándula mamaria .....	93
<b>Fig. 20:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para medir $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria.....	93
<b>Fig. 21:</b> Cromatogramas representativos de patrón y muestras de aceite. ....	96
<b>Fig. 22:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en aceite .....	98

<b>Fig. 23:</b> Cromatogramas representativos de patrón y muestras de dietas, obtenidos con el detector de UV y de fluorescencia (FD).	100
<b>Fig. 24:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en dietas por fluorescencia.	101
<b>Fig. 25:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en dietas por absorbancia.	102
<b>Fig. 26:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar acetato de $\alpha$ -tocoferol en dietas.	103
<b>Fig. 27:</b> Representación de la estabilidad de $\alpha$ -tocoferol y de acetato de $\alpha$ -tocoferol en dietas congeladas y descongeladas tras dos semanas.	109
<b>Fig. 28:</b> Cromatogramas representativos de patrón y muestra de sangre.	110
<b>Fig. 29:</b> Representación de la linealidad de $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en sangre.	111
<b>Fig. 30:</b> Concentración de vitamina E en las dietas del Experimento 1.	113
<b>Fig. 31:</b> Proporción de ácidos grasos en las distintas dietas empleadas en el Experimento 1.	114
<b>Fig. 32:</b> $\alpha$ -Tocoferol en plasma de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	119
<b>Fig. 33:</b> Cociente de $\alpha$ -tocoferol entre lípidos (triglicéridos y colesterol) en plasma de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	122
<b>Fig. 34:</b> Concentración de $\alpha$ -Tocoferol en hígado de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	124
<b>Fig. 35:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	126
<b>Fig. 36:</b> Concentración de $\alpha$ -Tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	128
<b>Fig. 37:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento.	130
<b>Fig. 38:</b> $\alpha$ -Tocoferol en placenta de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas.	132
<b>Fig. 39:</b> $\alpha$ -Tocoferol en hígado de fetos de ratas de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas.	134
<b>Fig. 40:</b> Correlación entre las concentraciones de $\alpha$ -tocoferol en plasma y en placenta de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas.	135

<b>Fig. 41:</b> Correlación entre las concentraciones de $\alpha$ -tocoferol en placenta y en hígado fetal de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas.....	135
<b>Fig. 42:</b> Correlación entre las concentraciones de $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal y en plasma de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas.....	135
<b>Fig. 43:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en plasma de ratas preñadas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	137
<b>Fig. 44:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en plasma de fetos de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	137
<b>Fig. 45:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en cerebro de fetos de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	137
<b>Fig. 46:</b> Evolución postnatal del peso de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	138
<b>Fig. 47:</b> Evolución postnatal de la talla de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	138
<b>Fig. 48:</b> Aparición de incisivos, apertura del conducto auricular y separación de párpados de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	139
<b>Fig. 49:</b> Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	140
<b>Fig. 50:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	140
<b>Fig. 51:</b> Adquisición del reflejo de giro en superficie de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	141
<b>Fig. 52:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	141
<b>Fig. 53:</b> Dos crías en el día 12 de lactancia pertenecientes a una camada O-L y a una camada PE-L.....	141
<b>Fig. 54:</b> Peso del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	142
<b>Fig. 55:</b> Peso del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	142
<b>Fig. 56:</b> Peso relativo del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	142
<b>Fig. 57:</b> Peso relativo del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	143

<b>Fig. 58:</b> $\alpha$ -tocoferol en plasma de madres alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia.....	144
<b>Fig. 59:</b> $\alpha$ -tocoferol en plasma de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia .....	144
<b>Fig. 60:</b> Cociente $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia .....	144
<b>Fig. 61:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia.....	145
<b>Fig. 62:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia .....	145
<b>Fig. 63:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia.....	145
<b>Fig. 64:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en las dietas empleadas en el Experimento 3.....	146
<b>Fig. 65:</b> Proporción de ácidos grasos en las distintas dietas empleadas en el Experimento 3 .....	147
<b>Fig. 66:</b> Ingesta durante la lactancia de ratas alimentadas con distintas dietas .....	148
<b>Fig. 67:</b> Peso corporal durante la lactancia de las ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva o de pescado suplementadas o no con acetato de vitamina E, ácido $\gamma$ -linolénico, o ácido araquidónico .....	149
<b>Fig. 68:</b> Peso corporal durante la lactancia de las crías de ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva o de pescado suplementadas o no con acetato de vitamina E, ácido $\gamma$ -linolénico, o ácido araquidónico .....	150
<b>Fig. 69:</b> Talla durante la lactancia de las crías de ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva o de pescado suplementadas o no con acetato de vitamina E, ácido $\gamma$ -linolénico, o ácido araquidónico .....	151
<b>Fig. 70:</b> Porcentaje de crías en las camadas en las que se produjo la aparición de incisivos, la apertura del conducto auricular y la separación de párpados en los días indicados. Crías de ratas que fueron alimentadas con la dieta de aceite de oliva, o de pescado, suplementada o no con acetato de $\alpha$ -tocoferol, con ácido $\gamma$ -linolénico, o ácido araquidónico .....	152
<b>Fig. 71:</b> Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	152
<b>Fig. 72:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico.....	153

<b>Fig. 73:</b> Adquisición del reflejo de giro en superficie de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico.....	153
<b>Fig. 74:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	153
<b>Fig. 75:</b> Peso del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	154
<b>Fig. 76:</b> Peso relativo del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	154
<b>Fig. 77:</b> Peso del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	155
<b>Fig. 78:</b> Peso relativo del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	155
<b>Fig. 79:</b> Concentración plasmática de $\alpha$ -tocoferol en ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico.....	156
<b>Fig. 80:</b> Concentración plasmática de $\alpha$ -tocoferol en crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	156
<b>Fig. 81:</b> Cociente $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma de crías cuyas madres tomaban dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	156
<b>Fig. 82:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	157
<b>Fig. 83:</b> $\alpha$ -tocoferol total en hígado de crías cuyas madres tomaban dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	157
<b>Fig. 84:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de $\alpha$ -tocoferol, ácido $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico .....	158
<b>Fig. 85:</b> Peso corporal durante la lactancia de las ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva (O-L) o de pescado (PE-L).....	159
<b>Fig. 86:</b> Producción de leche. Ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.....	160
<b>Fig. 87:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en la leche de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	160

<b>Fig. 88:</b> Pesos y pesos relativos de hígado, tejido adiposo lumbar y glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	161
<b>Fig. 89:</b> Evolución postnatal del peso de crías .....	162
<b>Fig. 90:</b> Evolución postnatal de la talla de crías.....	162
<b>Fig. 91:</b> Apertura de ojos y oídos y aparición de dientes en las crías .....	163
<b>Fig. 92:</b> Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	164
<b>Fig. 93:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire .....	164
<b>Fig. 94:</b> Tiempo de giro en superficie de crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	164
<b>Fig. 95:</b> Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie .....	165
<b>Fig. 96:</b> Peso del hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	165
<b>Fig. 97:</b> Peso del cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	165
<b>Fig. 98:</b> Peso relativo del hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas...	166
<b>Fig. 99:</b> Peso relativo del cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas..	166
<b>Fig. 100:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en el plasma de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	167
<b>Fig. 101:</b> Cociente $\alpha$ -tocoferol/ (triglicéridos + colesterol) en el plasma de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	167
<b>Fig. 102:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en el hígado de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	167
<b>Fig. 103:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en el hígado de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	167
<b>Fig. 97:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo lumbar de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. ....	168
<b>Fig. 98:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo lumbar de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	168
<b>Fig. 106:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	168
<b>Fig. 107:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado .....	168

<b>Fig. 108:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas.....	169
<b>Fig. 109:</b> Cociente $\alpha$ -tocoferol/ (triglicéridos + colesterol) en plasma de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	170
<b>Fig. 110:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	170
<b>Fig. 111:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	170
<b>Fig. 112:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas .....	171
<b>Fig. 113:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en las dietas empleadas en el Experimento 5.....	172
<b>Fig. 114:</b> Evolución del peso corporal de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas .....	173
<b>Fig. 115:</b> Ingesta media de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas .	174
<b>Fig. 116:</b> Peso del hígado en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno .....	174
<b>Fig. 117:</b> Peso del tejido adiposo lumbar en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	175
<b>Fig. 118:</b> Concentración plasmática de glucosa en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.....	175
<b>Fig. 119:</b> Concentración plasmática de TBARS en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.....	176
<b>Fig. 120:</b> Porcentaje de ácidos grasos en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.....	177
<b>Fig. 121:</b> Porcentaje de ácidos grasos saturados en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. ....	178
<b>Fig. 122:</b> Porcentaje de ácido oleico en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.....	178
<b>Fig. 123:</b> Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -6 en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. ....	179
<b>Fig. 124:</b> Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3 en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. ....	179

---

<b>Fig. 125:</b> Concentración plasmática de triglicéridos en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno .....	180
<b>Fig. 126:</b> Concentración plasmática de colesterol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno .....	180
<b>Fig. 127:</b> Concentración plasmática de $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno .....	181
<b>Fig. 128:</b> Cociente entre la concentración de $\alpha$ -tocoferol y la de triglicéridos más colesterol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno .....	181
<b>Fig. 129:</b> Concentración de 8-IP en orina de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	182
<b>Fig. 130:</b> Cantidad total de 8-IP en orina de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	183
<b>Fig. 131:</b> Concentración de hidroperóxidos en plasma de ratas diabéticas y no diabéticas alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno .....	183
<b>Fig. 132:</b> Cromatogramas de dos muestras de una misma sangre, procesadas con y sin EDTA. ....	184
<b>Fig. 133:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en sangre de ratas diabéticas y no diabéticas alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	185
<b>Fig. 134:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	185
<b>Fig. 135:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	186
<b>Fig. 136:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	186
<b>Fig. 137:</b> Cantidad total de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno.....	186



## Cuadros

<b>Cuadro 1:</b> Factores de recuperación aceptados según la AOAC.....	46
<b>Cuadro 2:</b> Valores máximos de RSD para aceptar la repetitividad del método.....	47
<b>Cuadro 3:</b> Composición de las dietas empleadas en los experimentos descritos en esta memoria. ....	58
<b>Cuadro 4:</b> Proporción de los distintos ácidos grasos presentes en los aceites empleados para la preparación de las dietas.....	59
<b>Cuadro 5:</b> Principales parámetros de la validación del método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo.....	91
<b>Cuadro 6:</b> Principales parámetros de la validación del método para medir $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria.....	94
<b>Cuadro 7:</b> Principales parámetros de la validación del método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en aceite.....	97
<b>Cuadro 8:</b> Concentración de $\alpha$ -tocoferol en los aceites empleados en nuestros experimentos.....	99
<b>Cuadro 9:</b> Principales parámetros de la validación del método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante FD.....	101
<b>Cuadro 10:</b> Principales parámetros de la validación del método para cuantificar $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante UVD.....	102
<b>Cuadro 11:</b> Principales parámetros de la validación del método para cuantificar acetato de $\alpha$ -tocoferol en dietas.....	103
<b>Cuadro 12:</b> Concentración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol) en dietas preparadas, congeladas y descongeladas tras dos semanas.....	108
<b>Cuadro 13:</b> Principales parámetros de la validación del método para medir $\alpha$ -tocoferol en sangre.....	111
<b>Cuadro 14:</b> Ingesta media durante la última semana de experimento de las ratas alimentadas con distintas dietas.....	115
<b>Cuadro 15:</b> Parámetros corporales de las ratas estudiadas a día 20 de gestación y tratamiento o día 20 de tratamiento.....	116
<b>Cuadro 16:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre los niveles de $\alpha$ -tocoferol en plasma.....	116
<b>Cuadro 17:</b> Comparación de las medias de $\alpha$ -tocoferol en plasma en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	116
<b>Cuadro 18:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre los niveles de $\alpha$ -tocoferol corregidos por lípidos totales en plasma.....	122
<b>Cuadro 19:</b> Comparación de las medias del cociente $\alpha$ -tocoferol/ (TG+COL) en plasma en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	122

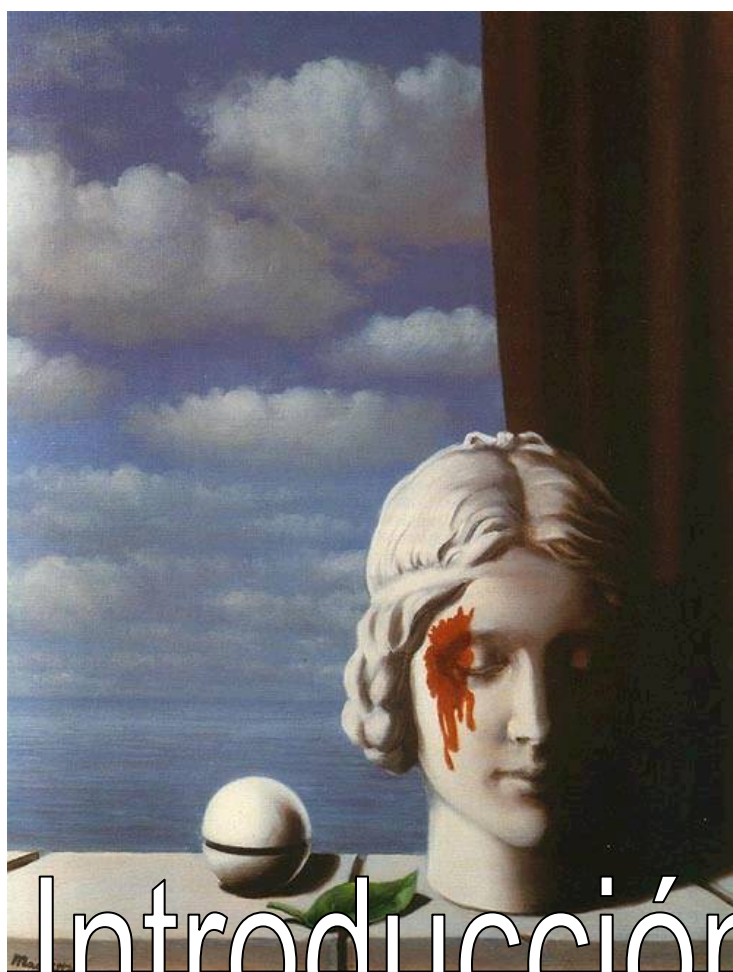
---

<b>Cuadro 20:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado. ....	124
<b>Cuadro 21:</b> Comparación de las medias de la concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	124
<b>Cuadro 22:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la cantidad de $\alpha$ -tocoferol en hígado. ....	126
<b>Cuadro 23:</b> Comparación de las medias de la cantidad de $\alpha$ -tocoferol en hígado en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. ....	126
<b>Cuadro 24:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar. ....	128
<b>Cuadro 25:</b> Comparación de las medias de la concentración de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación .....	128
<b>Cuadro 26:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la cantidad de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar. ....	130
<b>Cuadro 27:</b> Comparación de las medias de la cantidad de $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	130
<b>Cuadro 28:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de $\alpha$ -tocoferol en placenta.....	132
<b>Cuadro 29:</b> Comparación de las medias de la concentración de $\alpha$ -tocoferol en placenta en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	132
<b>Cuadro 30:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal. ....	134
<b>Cuadro 31:</b> Comparación de las medias de la concentración de $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación.....	134
<b>Cuadro 32:</b> p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la ingesta.....	148
<b>Cuadro 33:</b> Comparación de las medias de la ingesta en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación .....	148

## SIGLAS Y ABREVIATURAS EMPLEADAS

AA	Ácido araquidónico	LPL	Lipoproteína lipasa
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> de EE.UU.	MDA	Malondialdehído
ARR	Reflejo de giro en el aire	MTP	Proteína de transporte microsomal
DAG	Diacilglicerol	NF-κB	Factor nuclear κB
DAGK	Diacilglicerol Kinasa	NRC	<i>National Research Council</i> de EE.UU.
DHA	Ácido docosahexaenoico	O.O.	Ordenada en el origen
ED	Detección electroquímica	PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
EPA	Ácido eicosapentaenoico	PKC	Proteína Kinasa C
FD	Detección por fluorescencia	PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
FFA	Ácidos grasos libres	PP <sub>2</sub> A	Proteína fosfatasa <sub>2</sub> A
HDL	Lipoproteína de alta densidad	PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
HL	Lipasa hepática	ROS	Especies reactivas de oxígeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	RSD	Desviación típica relativa
HSL	Lipasa sensible a hormonas	SOD	Superóxido dismutasa
I.C.	Intervalo de confianza	SPF	Factor proteico del sobrenadante
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>	SRR	Reflejo de giro en superficie
IDDM	Diabetes mellitus insulino-dependiente (o tipo I)	STZ	Estreptozotocina
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia	TE	Equivalentes de tocoferol
8-IP	8-Isoprostaglandina F <sub>2α</sub> , 8-isoprostano	TMP	Peroxidación mediada por tocoferol
i.p.	Intraperitoneal	TBA	Ácido tiobarbitúrico
IU	Unidades internacionales de actividad de vitamina E	UV	Ultravioleta
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga	UVD	Detección ultravioleta
LDL	Lipoproteínas de baja densidad	VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
LSD	<i>Least Significant Difference</i>	α-TAP	Proteína asociada a α-tocoferol
		α-TBP	Proteína de unión a α-tocoferol
		α-TTP	Proteína transferidora de α-tocoferol





# Introducción



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Historia de la Vitamina E

En los últimos años, la vitamina E ha pasado de ser una sustancia con interés sólo para científicos a convertirse en una especie de panacea milagrosa, capaz de prácticamente cualquier cosa ya que, según la información a la que se puede acceder en Internet, “puede garantizar la óptima condición de nuestra piel y el funcionamiento de nuestras articulaciones, retrasa el envejecimiento y mejora el suministro de oxígeno del cuerpo” [1], o incluso, “es capaz de tonificar los músculos y nos permite tener un hígado y un corazón sanos; para todo esto y mucho más sirve la maravillosa (*sic*) vitamina E” [2].

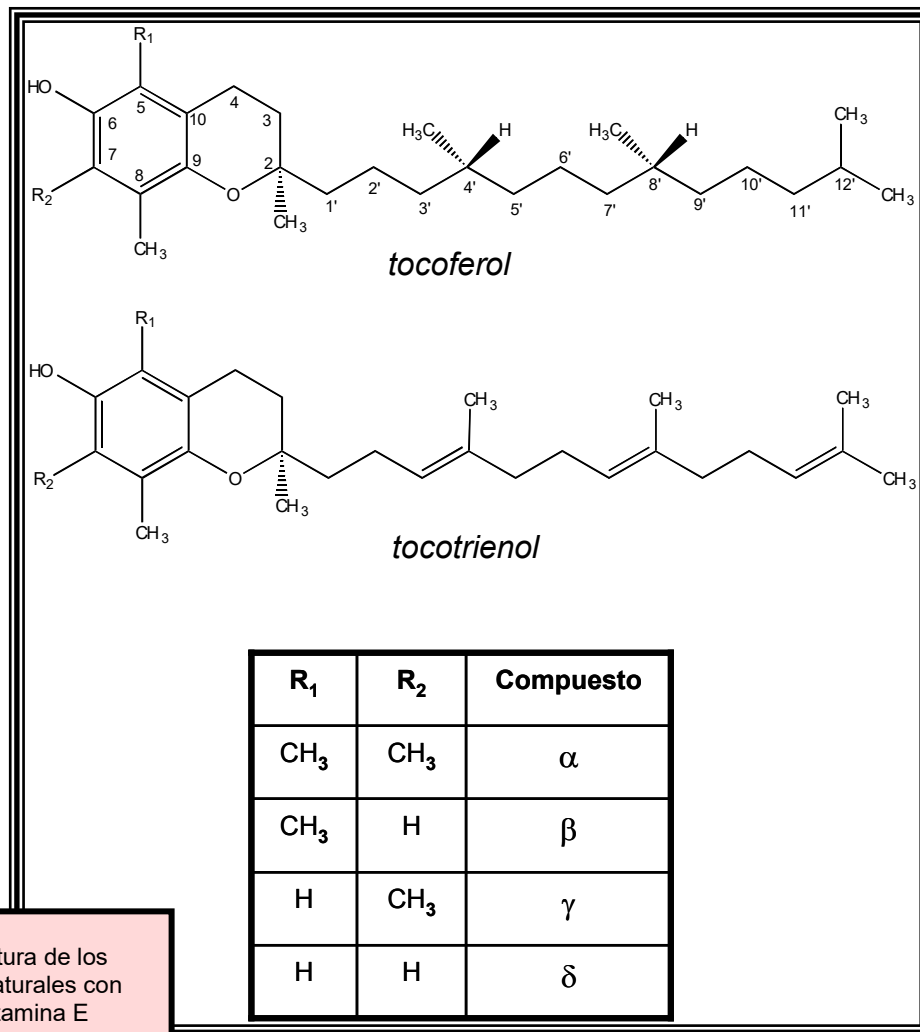
La vitamina E se descubrió en la década de 1920. Se sabía desde antes que cuando se administra una dieta pobre en grasa a ratas se produce una deficiencia en su capacidad reproductora. Esta deficiencia se caracteriza porque los machos presentan una espermatogénesis anormal, mientras que las hembras son incapaces de retener los cigotos [3]. En 1922, Herbert Evans y Katharine Bishop demostraron que había un factor liposoluble de la dieta (al que denominaron “factor X”), presente en la fracción insaponificable del aceite de germen de trigo, que revertía esa anormalidad [4]. Cuando se descubrió que ese factor era esencial para una reproducción normal en ratas [5], el factor X recibió la denominación de Vitamina E. Por haber sido descubierto como agente contra la infertilidad, Evans propuso en 1936 el nombre de tocoferol (del griego “*tokos*”, infancia y “*pherein*”, traer, portar, engendrar) [6].

La purificación de la vitamina E reveló que no hay sólo una molécula con actividad de vitamina E, sino que esta vitamina está en realidad constituida por una familia de compuestos muy relacionados entre sí [7], que en la actualidad se conocen de forma genérica como *tocoles* (Figs. 1 y 2).

Dentro de todos los compuestos que tienen actividad de vitamina E, en la Naturaleza sólo se han encontrado 8, que comparten una estructura común, como se puede ver en la Fig. 1: un anillo de cromano con un grupo alcoholico en la posición 6 y grupos metilo en las posiciones 2 y 8. A su vez, en las posiciones 5 y 7 puede haber un metilo (formas  $\beta$ - y  $\gamma$ -, respectivamente), dos ( $\alpha$ -) o ninguno ( $\delta$ -) y una cadena lateral (fitilo), con estructura isoprenoide con tres isoprenos saturados (tocoferoles) o con tres insaturaciones en la posición 2 de los isoprenos (toco-trienoles).

En general, se acepta que el  $\alpha$ -tocoferol es el más ampliamente distribuido en la dieta y el que tiene mayor actividad biológica [8-10] y los términos  $\alpha$ -tocoferol y vitamina E se utilizan a me-

nudo en la actualidad de manera indistinta. A pesar de este papel predominante del  $\alpha$ -tocoferol, actualmente se están revisando los posibles efectos positivos de las otras formas de vitamina E, pues en la dieta de un país como Estados Unidos, la principal forma de vitamina E es el  $\gamma$ -tocoferol [11, 12], que además podría tener funciones específicas propias, distintas de las del  $\alpha$ -tocoferol [13].



**Fig. 1:** Estructura de los compuestos naturales con actividad de vitamina E

El que la cadena lateral esté o no insaturada es muy importante: si el fitilo está saturado, en la molécula hay tres centros quirales, en los carbonos 2, 4' y 8'. En la Naturaleza sólo se sintetizan las formas *RRR* de los cuatro tocoferoles, pero si se sintetiza el tocoferol en el laboratorio a partir de fitol natural, el producto es una mezcla prácticamente equimolar de *RRR*- $\alpha$ -tocoferol y *SRR*- $\alpha$ -tocoferol, que se conoce como *2-ambo*- $\alpha$ -tocoferol. Si la síntesis química parte de un fitol no natural, no se puede discriminar entre las ocho formas posibles y así este  $\alpha$ -tocoferol sintético, mezcla racémica de los isómeros, se conoce como *dl*- $\alpha$ -tocoferol o *all rac*- $\alpha$ -tocoferol.



Esta estructura tridimensional está muy relacionada con la actividad, como se describe más adelante en esta misma Memoria.

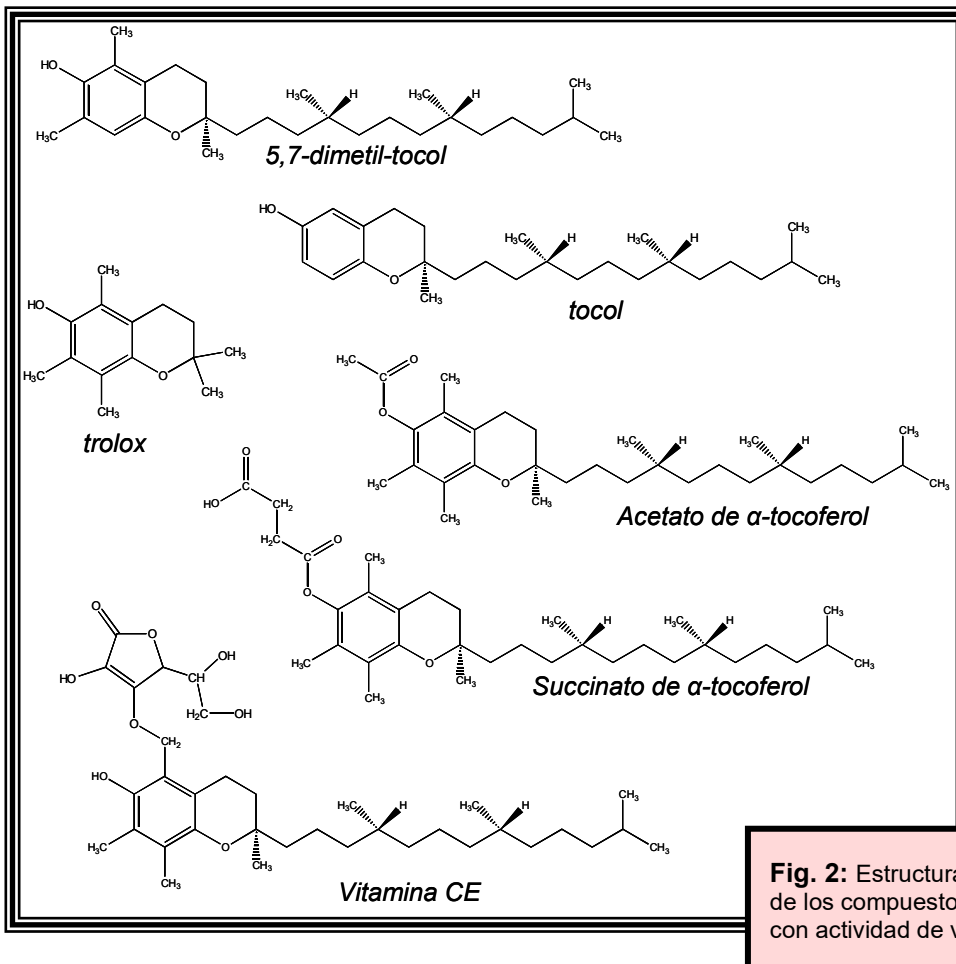
La determinación de la actividad de vitamina E de cada uno de los compuestos y por tanto de la ingesta recomendada, es un tema que en la actualidad todavía resulta controvertido [14-24], pues sigue sin estar clara la biodisponibilidad de la vitamina E [25]. La actividad biológica de vitamina E se ha determinado clásicamente según la cantidad de compuesto que puede prevenir síntomas de deficiencia en un modelo definido (en animales experimentales). Para ello se ha utilizado principalmente el ensayo de reabsorción fetal en la gestación, aunque también se han propuesto el test de hemólisis eritrocitaria inducida por ácido dialúrico, o el test de curación de la miopatía [26, 27]. La determinación de la actividad biológica no es un ensayo estandarizado ni fácil de realizar, pues con cada test los resultados pueden no ser homogéneos. Depende además mucho de otros factores como la dieta que acompaña a la administración, la vía de administración, etc.

En 1989, el *National Research Council* de Estados Unidos (NRC) recomendó que la actividad de vitamina E se expresara como "equivalentes de tocoferol" (*Tocopherol Equivalent*s o TE) [28], de manera que 1 mg de *RRR*- $\alpha$ -tocoferol sea 1 TE. Para los otros tocoferoles, la NRC propuso las siguientes biopotencias (en TE), basadas fundamentalmente en los ensayos de reabsorción fetal en la gestación:  $\beta$ -tocoferol, 0.5;  $\gamma$ -tocoferol, 0.1;  $\alpha$ -tocotrienol, 0.3. Nuevas investigaciones [16, 29-32] han llevado al NRC a reconsiderar todos los valores, sobre todo los de las formas sintéticas de  $\alpha$ -tocoferol y recomendar así que la biopotencia del  $\alpha$ -tocoferol natural sea considerada doble de la del sintético [33].

Antes de esto, se había consensuado que 1 mg de una mezcla racémica de acetato de  $\alpha$ -tocoferol equivaliera a una Unidad Internacional (IU, *International Unit*) de actividad de vitamina E y basándose en los ensayos de actividad biológica, se determinó que 1 mg de acetato de *RRR*- $\alpha$ -tocoferol equivale a 1.36 IU y 1 mg de *RRR*- $\alpha$ -tocoferol a 1.49 IU [34]. Estas unidades siguen siendo empleadas, por comodidad, sobre todo en preparados farmacéuticos, pues el acetato de  $\alpha$ -tocoferol es la forma más habitual de vitamina E en los suplementos vitamínicos.

Se han sintetizado también otros compuestos con actividad de vitamina E, algunos de los cuales se presentan en la figura 2. Unos son variaciones de la estructura común que no aparecen en la naturaleza (tocol, 5,7-dimetil-tocol) y otros son ésteres del  $\alpha$ -tocoferol, con distintas moléculas unidas por el hidroxilo en posición 6 al anillo cromano (acetato, succinato, nicotinato). Se acepta generalmente que estos ésteres tienen actividad porque sufren hidrólisis en el lumen del estómago, (aunque también se ha identificado una esterasa en retículo endoplásmico del enterocito [35]) y dan como producto el  $\alpha$ -tocoferol. El Trolox es un producto sintético, análogo hidrosoluble de la vitamina E, que se ha demostrado efectivo en los tratamientos de enfermeda-

des que suponen una absorción deficiente de lípidos, como es el caso de los defectos en la síntesis o secreción de sales biliares [36]. La vitamina CE se sintetizó en 1997 y tiene un potencial efecto terapéutico en casos en los que hay una mala absorción de vitamina E [37], en los que también podría ser beneficioso el succinato de  $\alpha$ -tocoferol [38].



**Fig. 2:** Estructura de alguno de los compuestos artificiales con actividad de vitamina E

Los animales no pueden sintetizar ninguno de estos compuestos y deben ser ingeridos de forma regular en la dieta, principalmente en aceites vegetales.

## 1.2 Funciones de la Vitamina E

Al contrario que con otras vitaminas, de la vitamina E no se conoce una enzima de la que sea cofactor, o que sea un precursor necesario para la síntesis de otros compuestos. Las funciones en las que se ha implicado a la vitamina E se pueden agrupar en dos grandes grupos: desde el descubrimiento de sus propiedades antioxidantes, ha sido considerada como el principal antioxidante en los medios lipídicos [39], pero recientemente se están descubriendo diversas acciones de la vitamina E que no están directamente relacionadas con sus propiedades antioxi-

dantes, sino con la posición que pueda ocupar en las membranas biológicas, modulando y regulando las actividades de distintas enzimas, además del efecto directo que puede tener sobre la fluidez y estabilidad de las membranas [40, 41].

### 1.2.1 Funciones no antioxidantes de la vitamina E

La vitamina E, como ya se ha indicado, fue primero descrita como antioxidante, pero muy poco después se empezaron a describir acciones y propiedades moleculares, celulares y fisiológicas que no estaban directamente relacionadas con la capacidad antioxidante [42-44]. Es difícil separar las funciones no antioxidantes de las propiedades antioxidantes, pues, por una parte, al actuar como protector de los ácidos grasos poliinsaturados o PUFA (*PolyUnsaturated Fatty Acids*), permite que se mantengan los niveles de ácidos grasos esenciales, como el ácido araquidónico, vitales para la función celular. Por otra parte, al permitir mantener bajo control los radicales libres, está implicada en la regulación de la situación redox global de la célula y esto puede tener mucha importancia en todos los procesos bioquímicos y moleculares que ocurren en la célula. En cualquier caso, sí está bien establecido que hay un conjunto de acciones no antioxidantes que son específicas del *RRR*- $\alpha$ -tocoferol, pues otras formas de vitamina E u otros antioxidantes no presentan las mismas características.

La vitamina E modula la síntesis de eicosanoides en varios puntos [45-49]. El *RRR*- $\alpha$ -tocoferol modula la función enzimática de la *PLA*<sub>2</sub> (*PhosphoLipase A*<sub>2</sub>), que cataliza la liberación de araquidónico desde los fosfolípidos de membrana. Esta modulación es positiva o negativa, dependiendo del tipo celular: así, se ha demostrado que el *RRR*- $\alpha$ -tocoferol inhibe la síntesis de *PGE*<sub>2</sub> (*ProstaGlandin E*<sub>2</sub>) en plaquetas porque disminuye la actividad de la *PLA*<sub>2</sub>, pero estimula la síntesis de *PGI*<sub>2</sub> (*ProstaGlandin I*<sub>2</sub>) porque estimula a la *PLA*<sub>2</sub> de células del endotelio vascular. Esto facilita la circulación, en general, puesto que disminuye la agregación plaquetaria y disminuye la contracción vascular. Pero además, se sabe que existe una zona reguladora modulada por *NF- $\kappa$ B* (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*) en la región promotora del gen de la ciclooxigenasa [50], que cataliza el primer paso de la síntesis de prostaglandinas y prostaciclina a partir de ácido araquidónico. El *NF- $\kappa$ B* es un modulador de la expresión génica de la célula sensible al estado redox de la célula [51].

La capacidad del  $\alpha$ -tocoferol para inhibir la proliferación celular se describió primero en cultivos de células de músculo liso y se ha demostrado que lo hace porque inhibe la actividad de la *PKC* (*Protein Kinase C*) [52-57]. Posteriormente se ha demostrado esta capacidad inhibitoria sobre la *PKC* y sobre el crecimiento y la proliferación celular, en distintos tipos celulares, que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células mesangiales [58-64].

Esta inhibición la produce el  $\alpha$ -tocoferol, pero no compuestos como el  $\beta$ -tocoferol o el trolox, que tienen acción antioxidante, por lo que no puede relacionarse con la actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol [65, 66]. A su vez, dicha inhibición no está causada por la interacción directa entre la molécula de  $\alpha$ -tocoferol y la proteína, ni porque el  $\alpha$ -tocoferol inhiba la expresión de PKC en ninguna de sus etapas, sino por una modulación de la actividad de la proteína. En aortas de ratas diabéticas, que tienen la PKC muy elevada como consecuencia de la estimulación mediada por los niveles elevados de glucosa, la inyección intraperitoneal de vitamina E normaliza la actividad de PKC, lo cual corresponde a una inhibición de la intensificación de la isoforma  $\beta$ II [67, 68].

El  $\alpha$ -tocoferol estimula la actividad de la  $PP_2A$  (*Protein Phosphatase<sub>2</sub> A*), que desfosforila a la PKC, inhibiendo así su actividad [69-72]. A su vez, en ratas diabéticas, el  $\alpha$ -tocoferol puede prevenir la disfunción glomerular, por inhibición de la PKC mediada por la ruta del diacilglicerol (*DiAcylGlycerol*, DAG), efector clásico de la PKC. Esta acción la realiza el  $\alpha$ -tocoferol activando a la DAGK (*DAG Kinase*), que fosforila al DAG, disminuyendo así los niveles de DAG y, consecuentemente, la actividad de PKC [63].

En relación con las posibles nuevas funciones de la vitamina E, hay que reseñar que la  $\alpha$ -TTP ( *$\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein*), comentada más en profundidad más adelante en esta Memoria, no es la única proteína que une  $\alpha$ -tocoferol, pues se han identificado otras proteínas que tienen afinidad por el  $\alpha$ -tocoferol: En cultivos de células de glioma y neuroblastoma se identificaron en 1981 varias proteínas citosólicas que unen *RRR*- $\alpha$ -tocoferol [73]. Más recientemente se ha encontrado que tanto el hígado como el corazón contienen una  $\alpha$ -TBP (*Tocopherol Binding Protein*) de 14.2 kDa que transfiere  $\alpha$ -tocoferol antes que  $\gamma$ - o  $\delta$ -tocoferol [74] y en el citosol del hígado se identificaron una proteína de 30-36 kDa [75] y otra de 15 kDa [76-78]. Estas proteínas y otras  $\alpha$ -TAP (*Tocopherol Associated Protein*) que se están caracterizando en la actualidad [79], parecen estar implicadas en el destino intracelular del  $\alpha$ -tocoferol. Mediante el uso de una columna de afinidad por  $\alpha$ -tocoferol se aislaron múltiples  $\alpha$ -TBPs (de 81, 58 y 31 kDa) del citosol de células de músculo liso en cultivo, que tienen afinidad por distintas zonas de la molécula de  $\alpha$ -tocoferol, pues el polipéptido de 58 kDa eluía de la columna al añadir a la columna cromanol y el de 81 kDa al añadir fitol [78]. Se han descrito también proteínas de membrana que unen  $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos e hígado humanos [80-83], que parecen estar implicadas en la regulación de los niveles intracelulares de  $\alpha$ -tocoferol y pueden tener mucha importancia en la prevención de la hemólisis eritrocitaria mediada por  $\alpha$ -tocoferol. En células del endotelio de aorta bovina también se han encontrado sitios específicos de unión de *RRR*- $\alpha$ -tocoferol, que podrían incluso estar implicados en la regulación de la síntesis de prostaciclina [84, 85].

Se han encontrado evidencias experimentales que, tomadas en conjunto, parecen indicar que

la vitamina E podría modular la expresión de algunos genes, al haberse purificado proteínas cuya función parece ser transportar  $\alpha$ -tocoferol al núcleo y facilitar la unión del  $\alpha$ -tocoferol a la cromatina [86, 87] pero esta posible acción de la vitamina E no ha sido estudiada en profundidad. El  $\alpha$ -tocoferol puede estar también relacionado con la síntesis del colesterol, pues el SPF (*Supernatant Protein Factor*), una de las moléculas reguladoras de la síntesis de colesterol, ha sido identificado también como TAP y podría, además de su función estimuladora de la síntesis de colesterol, funcionar como un factor de transcripción dependiente de  $\alpha$ -tocoferol [88].

## 1.2.2 Funciones antioxidantes: Vitamina E y radicales libres

### 1.2.2.1 Estrés oxidativo y peroxidación lipídica.

El estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad del organismo para neutralizar ese exceso de radicales libres mediante las defensas antioxidantes.

Un radical libre es cualquier especie química con existencia independiente (de aquí el término "libre"), que contiene uno o más electrones desapareados; es decir, que ocupan un orbital atómico o molecular en solitario [89]. La naturaleza de radical libre de un átomo o molécula se representa normalmente mediante un punto arriba y a la derecha de la molécula (por ejemplo,  $H^{\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ).

Por efecto de ese orbital desapareado, los radicales libres son especies muy reactivas. Aunque se pueda establecer una gradación en esta capacidad para reaccionar prácticamente con toda molécula que se encuentre próxima [90], todos los radicales libres son extremadamente reactivos.

Cuando se encuentran dos radicales libres, sus electrones desapareados se pueden unir para formar un par y ambos radicales se neutralizan. Sin embargo, dado que la mayoría de las moléculas presentes en los seres vivos no tienen electrones desapareados, cualquier radical libre que se produzca reaccionará lo más seguro con un no-radical, arrancándole un electrón y generando un nuevo radical libre, que puede reaccionar igual que el anterior con otro no-radical y así sucesivamente. Es decir, que las reacciones iniciadas por radicales libres tienden a proceder como reacciones en cadena y en los seres vivos los radicales libres suelen iniciar estas reacciones mediante la sustracción de  $H^{\cdot}$  a otras moléculas [91].

En la célula, la oxidación de nutrientes (carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos) ocurre en numerosos pasos y de forma controlada, a fin de aprovechar con mayor eficiencia la energía liberada. Una consecuencia directa de este mecanismo es que, entre los nutrientes iniciales y la liberación de energía al final del proceso, se generan moléculas con distinto estado de oxi-

dación, algunas de las cuales también pueden entregar uno o dos electrones al oxígeno. Esto produce una reducción incompleta del oxígeno y aparecen intermediarios parcialmente reducidos, tales como el anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El  $O_2^{\cdot-}$  se produce cuando una molécula de oxígeno capta un electrón, que se aparea con uno de los dos electrones solitarios del oxígeno, dejando sólo uno desapareado. El comportamiento químico del  $O_2^{\cdot-}$  difiere enormemente dependiendo del medio en que se encuentre: en agua, excepto a pHs muy ácidos, no es muy reactivo; puede actuar a veces como un oxidante débil, aceptando un electrón. Por ejemplo, puede oxidar al ácido ascórbico (forma reducida de la vitamina C) y formar el radical ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno y puede actuar también como agente reductor, por ejemplo del ion férrico, donando su electrón y regenerando el oxígeno. Sin embargo, en solventes orgánicos o en ambientes hidrofóbicos es mucho más reactivo, por lo que cualquier  $O_2^{\cdot-}$  generado en el interior de membranas biológicas puede causar un daño considerable [90].

Parte del superóxido se genera por "accidentes químicos" inevitables, en los que moléculas del organismo reaccionan directamente con el oxígeno para dar superóxido. Ejemplos de este proceso incluyen las catecolaminas, tetrahidrofolatos y algunos componentes de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Este último caso es especialmente representativo, pues la fuente intracelular más importante de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  es la mitocondria, capaz de reducir parcialmente el oxígeno. Aproximadamente el 98% del oxígeno que respiramos se consume en la cadena respiratoria y un 1-2% de este oxígeno no es completamente reducido y se convierte en  $O_2^{\cdot-}$  en dos lugares de la cadena respiratoria: en la NADH deshidrogenasa y en la autooxidación de la coenzima Q o ubiquinona [92-95]. Esto supone que cerca del 90% de los radicales libres que se originan en el organismo provienen de la reducción del oxígeno para dar agua en la cadena respiratoria. Es decir, que continuamente se está produciendo una gran cantidad de radicales libres, en un ambiente especialmente favorecedor para su acción dañina, pues los componentes de la cadena respiratoria están todos embebidos en un ambiente hidrofóbico, la membrana interna mitocondrial, y, como ya se ha indicado, el  $O_2^{\cdot-}$  es mucho más reactivo en un medio apolar. La producción de  $O_2^{\cdot-}$  está normalmente controlada o contrarrestada por las enzimas que realizan la función de Superóxido Dismutasa (SOD). A su vez, el potencial tóxico del  $O_2^{\cdot-}$  se ilustra por el hecho de que los ratones genéticamente modificados que no expresan la SOD que se acumula en la mitocondria (*SOD2*) nacen mucho más pequeños y no sobreviven más allá de unos días, muriendo con una cardiomiopatía aguda [96].

Otra de las fuentes normales de  $O_2^{\cdot-}$  son los leucocitos polimorfonucleares, cuya función involucra específicamente la generación de estos oxidantes por el sistema NADPH oxidasa [97, 98] como primera línea de defensa contra posibles agentes patógenos. En este caso, la generación de especies oxidantes cumple un papel beneficioso ya que impide la proliferación de tales

agentes. Más aún, la deficiencia genética del sistema causa una enfermedad letal: la granulomatosis crónica [99].

En condiciones normales las concentraciones intracelulares de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  han sido estimadas en  $10^{-9}$  y de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M, respectivamente [100, 101]. La reacción entre estas dos especies en presencia de metales, lleva a la formación de otro radical, el radical hidroxilo:  $OH^{\cdot}$ . Éste es uno de los oxidantes más potentes que existen, capaz de sustraer átomos de hidrógeno de cualquier molécula biológica (DNA, lípidos, polisacáridos del líquido sinovial, etc.) para formar agua. Este proceso de formación de  $OH^{\cdot}$  se conoce como Reacción de Fenton y en la actualidad se discute su importancia *in vivo*, pues el hierro y el cobre, que serían los principales iones del organismo que podrían dar lugar a esta reacción, no se encuentran en estado libre, sino asociados a proteínas tales como la hemoglobina, mioglobina, transferrina o ferritina (hierro), o la albúmina y la ceruloplasmina (cobre), en formas no disponibles para la reacción de Fenton [102, 103]. La radiación electromagnética de baja longitud de onda, como la de los rayos gamma o los rayos X, puede romper las moléculas de agua del organismo y generar así el radical hidroxilo,  $OH^{\cdot}$  [104], propiedad que ha sido aprovechada para estudiar las propiedades de las reacciones iniciadas por radicales libres [90, 105]. La mayor parte del daño causado a los seres vivos por las radiaciones ionizantes está causado por las consecuencias del ataque del radical  $OH^{\cdot}$  sobre las moléculas biológicas. Tiene un gran potencial destructor en medios biológicos, ya que ataca a todas las moléculas en cuanto se produce, lo que da lugar a reacciones de radicales libres en cadena. Puesto que el  $OH^{\cdot}$  es tan reactivo, la reacción ocurre rápidamente en el mismo sitio en que se produce este radical.

El peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), es otra especie altamente oxidante [106, 107], que se produce normalmente como consecuencia de la reacción entre el  $O_2^{\cdot-}$  y el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ). El  $NO^{\cdot}$  es un metabolito normal en el metabolismo celular producido por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa sobre el aminoácido arginina. Fisiológicamente, el  $NO^{\cdot}$  es un vasodilatador generado por las células endoteliales y macrófagos [108], pero el producto de la reacción con el  $O_2^{\cdot-}$  es un oxidante muy poderoso. Se cree que el mecanismo por el que el peroxinitrito inicia la peroxidación lipídica es porque se descompone en  $OH^{\cdot}$  y  $NO_2^{\cdot}$ , dos especies fuertemente oxidantes [109].

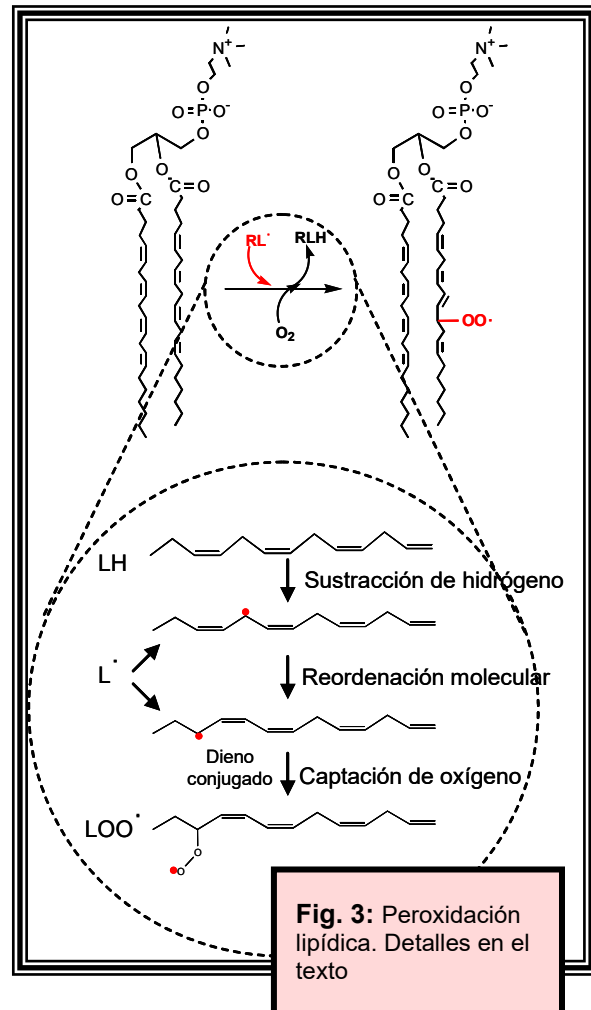
En resumen, en condiciones normales los organismos aerobios están expuestos a un estado estacionario basal de oxidantes que, en la mayoría de los casos, se generan de forma accidental. Las células se hallan resguardadas contra esta producción basal por una serie de enzimas (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y de compuestos no proteicos (glutatión, vitamina C, vitamina E, beta-carotenos, etc.) que previenen el daño celular. La generación de especies oxidantes es un proceso inevitable que ocurre como consecuencia de la adaptación de organismos a la vida en aerobiosis. La protección natural contra estos oxidantes es limitada y puede ser sobrepasada, en diferentes condiciones, llevando a lesiones y causar, eventualmente, la muerte celular.

### 1.2.2.1.1 Proceso de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es la consecuencia más estudiada del ataque de los radicales libres. En presencia de generadores de radicales libres, como el calor, metales o radiaciones, los lípidos insaturados (LH) forman radicales alquilo centrados en el carbono ( $L^\cdot$ ), que sufren una reorganización molecular que da como resultado un dieno conjugado, como se puede apreciar en la Fig. 3. Bajo condiciones aerobias, estos radicales alquilo reaccionan muy rápidamente con el oxígeno y se forman radicales peróxido ( $LOO^\cdot$ ), que pueden propagar este proceso en presencia de oxígeno mediante una reacción en cadena de radicales libres para formar hidroperóxidos ( $LOOH$ ) y nuevos radicales peróxido como producto primario de la autoxidación [110, 111].

Los PUFA son diana preferente de la acción de los radicales libres, ya que la presencia de varios dobles enlaces hace más lábiles los enlaces C-H de los átomos de carbono adyacentes a los dobles enlaces.

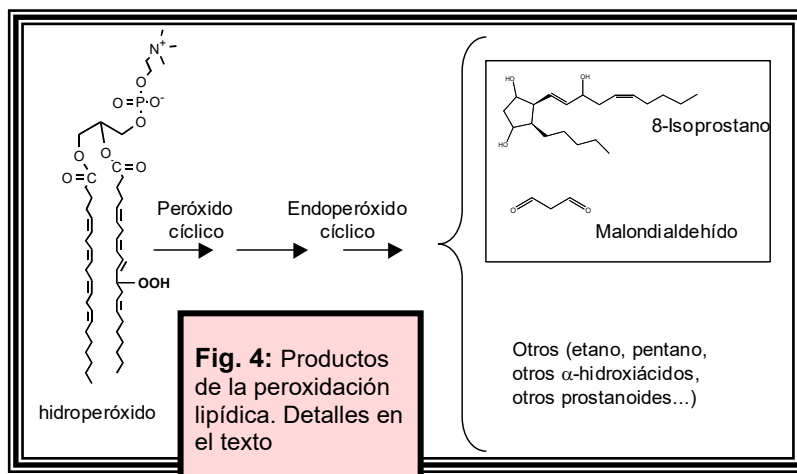
Los hidroperóxidos lipídicos son relativamente estables, pero son rápidamente descompuestos por el organismo en un amplio rango de compuestos: carbonilos, hidrocarburos, cetonas y otras sustancias [110]. En la Fig. 4 se representan dos de los más característicos: El malondialdehído (MDA) y la 8-isoprostaglandina  $F_{2\alpha}$  (u 8-isoprostano, 8-IP). El MDA es especialmente impor-



**Fig. 3:** Peroxidación lipídica. Detalles en el texto



tante como producto final, ya que se emplea como indicador de los procesos de peroxidación lipídica, aunque se estima que sólo un 2% de la cantidad total de MDA proviene de la peroxidación lipídica [36]. Los isoprostanos son un conjunto de compuestos similares a las prostaglandinas que se producen por la peroxidación del ácido araquidónico mediada por radicales libres,



en un proceso independiente de la ciclooxigenasa o endoperóxido sintasa [112, 113]. Dado que son productos únicamente de la acción de los radicales libres, su determinación y principalmente la del 8-IP, está siendo cada vez más habitual en muchos estudios experimentales como índice de peroxidación [114-117].

### 1.2.2.2 Propiedades antioxidantes de la Vitamina E

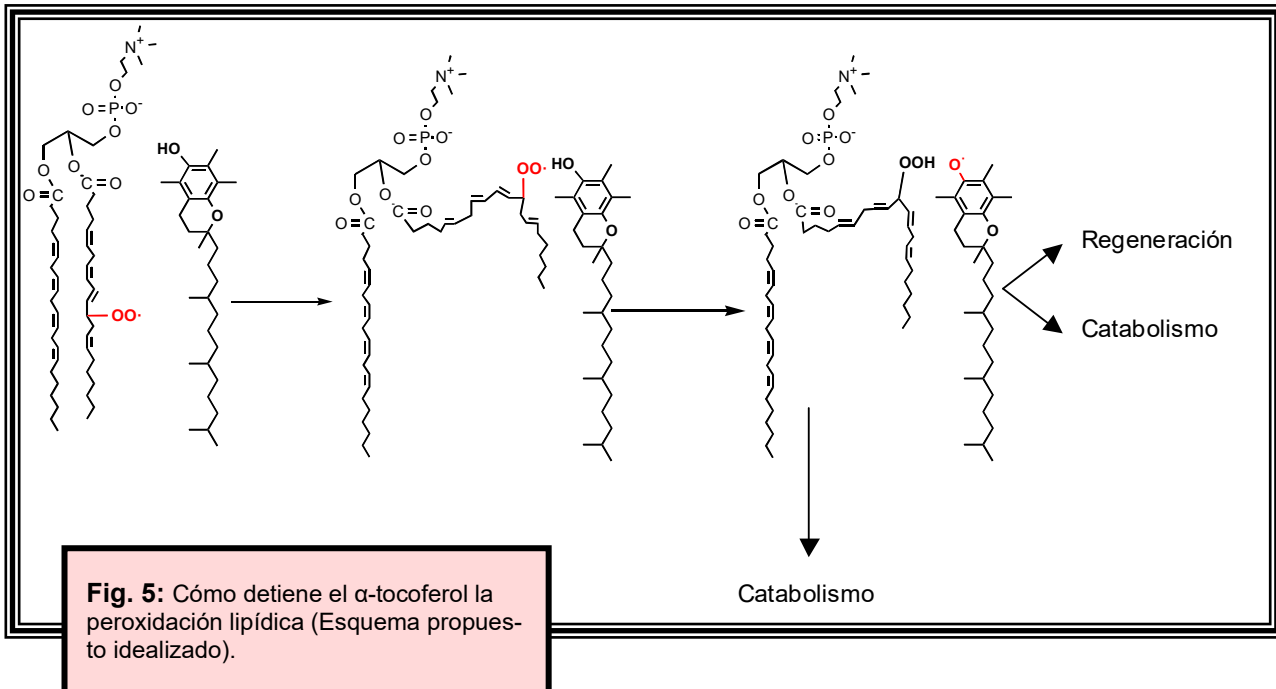
La vitamina E es un antioxidante muy eficaz cuando se encuentra en el núcleo hidrofóbico de las membranas celulares. Tiene la capacidad de neutralizar a los radicales peroxilo, cuya avidez por el protón del  $\alpha$ -tocoferol es mayor que la que tienen por los protones de los ácidos grasos colindantes [90], interrumpiendo así la cadena de la peroxidación lipídica [39]. El radical tocoferoxilo formado, además, es mucho menos reactivo y puede ser regenerado a  $\alpha$ -tocoferol mediante la vitamina C.

Las propiedades antioxidantes del  $\alpha$ -tocoferol se deben a la oxidación del  $-OH$  fenólico (v. Fig. 1), en un proceso global de transferencia de un átomo de hidrógeno mediante un mecanismo dual de transferencia de un solo electrón y de abstracción directa del átomo de H [118]. Dado que el radical tocoferoxilo que se produce se estabiliza por resonancia, no propaga la peroxidación lipídica y puede combinarse con otros radicales para producir productos no radicales [119]. Estas propiedades únicas del  $\alpha$ -tocoferol han llevado a afirmar que la vitamina E es el principal antioxidante en medios hidrofóbicos en el organismo [39, 120].

Aunque se ha propuesto la importancia del  $\alpha$ -tocoferol en detener el proceso de peroxidación lipídica en la fase de iniciación, por reaccionar directamente con los radicales libres que van a originar la reacción en cadena [121, 122], parece que el papel protector lo ejerce principalmente deteniendo la propagación de la peroxidación, como se representa idealmente en la Fig. 5 [90, 123].

Este mecanismo es sobre todo válido para el  $\alpha$ -tocoferol, pero se ha demostrado que el  $\gamma$ -tocoferol puede ser incluso más eficaz en la detoxificación de sistemas en los que haya una

producción excesiva de especies reactivas de nitrógeno ( $\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$ ,  $\text{ONOO}^\cdot$ ), que atacan a la posición 5 del cromanol (v. Fig. 1), que en el  $\alpha$ -tocoferol está ocupada por un grupo metilo [124-126].

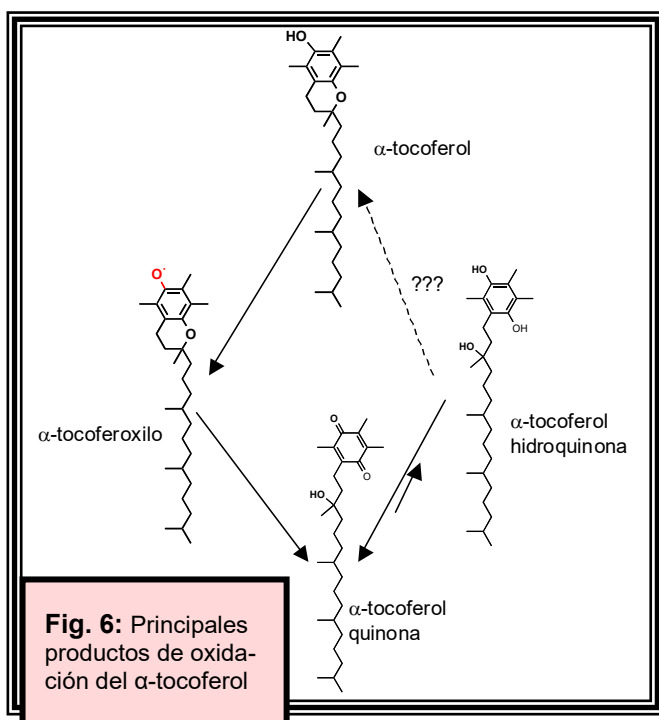


Se ha demostrado la regeneración *in vivo* del radical tocoferoxilo [127], aunque el mecanismo (enzimático o no enzimático) encargado de esta regeneración no está todavía elucidado. Sí se ha demostrado que la vitamina C es capaz de esta regeneración [128] y existen evidencias de una sinergia entre estas dos vitaminas en el proceso de control de la peroxidación lipídica [129-133].

Hay varios estudios que demuestran el papel protector de la vitamina E en situaciones inducidas de estrés oxidativo: la administración de vitamina E disminuye los productos de la peroxidación lipídica [134, 135] y otros marcadores de daño hepático [136] en animales sometidos a tratamientos con cationes o con drogas que aumenten el estrés oxidativo. Este efecto protector se ha estudiado también *ex vivo* en células, fracciones celulares u homogenados provenientes de distintos tejidos [137-145]. La disminución de productos de peroxidación lipídica en situaciones basales se ha demostrado en cepas especiales de animales experimentales, como en ratas genéticamente obesas [146] o en ratas que no pueden sintetizar su propia vitamina C cuando toman dietas sin vitamina C [147-149]. La disminución de los niveles basales de productos de peroxidación tras tratamiento con vitamina E se ha demostrado en ratas [117, 150], pero no se han observado diferencias en humanos [151]. También se ha demostrado el razo-

namiento inverso, es decir, que cuando la dieta es pobre en vitamina E aumentan los productos de peroxidación [152].

El radical tocoferoxilo proveniente de la peroxidación lipídica puede derivar en multitud de com-



puestos, dependiendo de muchas variables experimentales. Estos productos de la oxidación del α-tocoferol han sido intensamente estudiados por Liebler *et al*, que han identificado tocoferonas, epoxitocoferonas y epoxiquinonas [153-158], como metabolitos intermedios y finales de la peroxidación. Estos autores, sin embargo, han demostrado que, cuando la oxidación del α-tocoferol no supera el 20%, el producto mayoritario de la oxidación del α-tocoferol es la α-tocoferol quinona, que puede ser reducida por enzimas celulares a la α-tocoferol hidroquinona [159-163], como se presenta en la Fig. 6.

Estos compuestos podrían tener funciones biológicas propias y no ser meros productos de la oxidación del α-tocoferol, como lo demuestra el hecho de que se obtenga α-tocoferol quinona cuando se administra tirosina y mevalonato marcados radiactivamente a ratas [161]. Se ha demostrado que la ingesta de α-tocoferilquinona eleva los niveles de α-tocoferol en plasma de humanos [164], pretendiéndose con ello demostrar la reversibilidad *in vivo* del proceso redox, pero hasta ahora han fallado los intentos de encontrar un mecanismo que reduzca la α-tocoferol quinona a α-tocoferol [165], aunque pueda parecer sencillo el paso de α-tocoferol hidroquinona a α-tocoferol, que no supone más que una deshidratación y reciclación.

### 1.2.2.3 Actividad prooxidante del α-tocoferol.

Se ha propuesto recientemente que el α-tocoferol puede ejercer una actividad prooxidante en las lipoproteínas, habiéndose desarrollado incluso un modelo de peroxidación mediada por tocoferol (TMP, *Tocopherol Mediated Peroxidation*) [166] mediante el cual se han intentado explicar resultados en los que parece que el α-tocoferol podría promover la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*) *in vitro* mediante procesos de transferencia en fase, captando radicales del medio acuoso y en cadena, puesto que el radical

$\alpha$ -tocoferoxilo puede llegar a atrapar un hidrógeno de los PUFA, desencadenando la peroxidación lipídica [166-169].

Según este modelo, para que el  $\alpha$ -tocoferol ejerza eficazmente su función como antioxidante, se necesitan coantioxidantes que impidan la peroxidación lipídica a partir del  $\alpha$ -tocoferol [167, 170]. Esta TMP parece ser más importante en condiciones de producción baja o moderada de radicales libres y gran abundancia de  $\alpha$ -tocoferol [171].

Esta hipótesis todavía no ha sido inequívocamente demostrada *in vivo*, por lo que actualmente es motivo de controversia, aunque sí existen situaciones en las que la administración de dosis elevadas de vitamina E causa efectos opuestos a los de dosis moderadas [172].

## 1.3 Metabolismo de la Vitamina E

### 1.3.1 Absorción intestinal y transporte

La absorción intestinal y transporte en sangre de la vitamina E está asociada a la absorción y transporte de los lípidos [173-175] y es dependiente de las enzimas pancreáticas [176]. Además, como ocurre con todos los lípidos hidrofóbicos, para la absorción intestinal de la vitamina E son necesarias las micelas, formadas por la acción de los ácidos biliares y las lipasas pancreáticas [35], como se ha demostrado en ratas con el conducto biliar ligado [177, 178] y en niños con colestasis hepática [179-181]. Se ha estimado que la proporción de tocoferol absorbido en el intestino puede estar entre el 65 y el 70% [182-184], aunque estos porcentajes parecen depender mucho de la cantidad de vitamina E administrada.

Existe poca información disponible acerca de la influencia de la grasa de la dieta sobre la absorción de vitamina E, y, aunque los resultados son contradictorios, existe quizá una mayor cantidad de evidencias documentales de que la absorción de vitamina E no es mayor aumentando la cantidad de grasa de la dieta. Dimitrov *et al* [185], a partir de un pequeño estudio en humanos con deficiencias en vitamina E a los que se les administraban grandes dosis de vitamina E, llegaron a la conclusión de que la grasa de la dieta incrementaba la absorción de vitamina E, pero más recientemente, Roodenburg *et al* [186] demostraron que la cantidad de grasa en la dieta no afectaba a la biodisponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol. En estudios en ratas, se ha encontrado que no hay diferencias en el porcentaje de  $\alpha$ -tocoferol absorbido cuando la cantidad de grasa en la dieta variaba entre un 0.7% y un 19% [187] y que no hay diferencias en la cantidad de vitamina E excretada en las heces variando la cantidad de grasa de la dieta entre un 15% y un 30% [188].

El tipo de grasa de la dieta (con mayor o menor proporción de ácidos grasos satura-

dos/insaturados) es posible que también pueda influir en el mecanismo de absorción intestinal de vitamina E, pero no existe literatura concluyente al respecto: Gallo-Torres *et al*, en ratas que recibían la administración intragástrica de vitamina E junto con lípidos, encontraron que aparecía más cantidad de vitamina E marcada radiactivamente en la linfa cuando la vitamina E se administraba con una mayor cantidad de grasa saturada [189]. Por otra parte, también se ha demostrado que el porcentaje de PUFA (en concreto linoleico, C<sub>18</sub>:2 $\omega$ -6) en la dieta de ratas disminuye la cantidad de vitamina E excretada en heces [188], lo cual se ha intentado relacionar con la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol absorbida por el intestino.

No existe evidencia documental específica acerca de la absorción intestinal de  $\alpha$ -tocoferol durante la gestación, pero se sabe que durante esta etapa, la absorción intestinal de triglicéridos de la dieta y su aparición en plasma se incrementa considerablemente en la rata gestante [190]. Sería pues esperable que también aumentara la absorción intestinal de todas las formas de vitamina E. De hecho, tras la administración oral de  $\alpha$ -tocoferol aparece mayor proporción de este compuesto en plasma en ratas gestantes que en no gestantes [191], lo que apoyaría la mayor absorción intestinal de  $\alpha$ -tocoferol en la gestante.

Hay experimentos que parecen demostrar que el  $\alpha$ -tocoferol es absorbido mediante un proceso de difusión pasiva desde el intestino delgado al enterocito [184]. También parece claro que el transporte del  $\alpha$ -tocoferol a través del enterocito es un proceso pasivo, asociado a los lípidos derivados de la dieta. El  $\alpha$ -tocoferol sin esterificar y las otras formas de vitamina E que se hayan podido absorber son entonces incorporados a quilomicrones de forma inespecífica [31, 174, 192, 193] y los quilomicrones son secretados a los capilares linfáticos. Si se inhibe la síntesis de quilomicrones se inhibe también la salida de vitamina E a la linfa y la cinética de aparición y disminución del  $\alpha$ -tocoferol administrado oralmente es paralela a la de los quilomicrones (entre 5 y 6 horas) [194, 195]. Ello apoya la hipótesis de que la absorción de vitamina E sólo depende de la capacidad de sintetizar los quilomicrones, para la que los únicos factores limitantes parecen ser la disponibilidad de sus componentes y la actividad de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP, *Microsomal Transport Protein*) [196]. Pero se desconoce el mecanismo por el que la vitamina E entra a formar parte de los quilomicrones recién sintetizados y si es la propia MTP la que incorpora la vitamina E. Esta incorporación no depende de una proteína que discrimine entre las distintas formas, ya que la concentración de las distintas formas de vitamina E en los quilomicrones sólo depende de la cantidad que se ingiera de cada una [31, 197-200].

La enzima Lipoproteína Lipasa (LPL), que se encuentra anclada en el endotelio capilar de tejidos extrahepáticos por moléculas de heparán sulfato [201], hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones para dar glicerol y ácidos grasos libres (FFA, *Free Fatty Acids*) y promueve así la formación de remanentes de quilomicrones. Estos remanentes intercambian componentes su-

perforales con las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) y mediante este intercambio adquieren apoproteína E. Mediante un receptor específico de apoproteína E localizado en las células parenquimáticas del hígado, los remanentes son captados por el hígado [202]. De esta forma, moléculas de vitamina E procedentes de la dieta terminan siendo descargadas en el hígado [193]. Las HDL pueden transferir el tocoferol que han adquirido a las otras lipoproteínas circulantes [203-205], por lo que a las 6-9 h de la administración oral de tocoferol deuterado, en el hombre todas las lipoproteínas circulantes lo contienen de forma casi equimolecular y proporcional a la cantidad administrada [194].

No se ha descrito ninguna molécula que sea un transportador específico de vitamina E en plasma en humanos ni en ratas y por tanto, la vitamina E depende de las lipoproteínas plasmáticas para viajar de unos tejidos a otros. Toda la vitamina E que se encuentra en el plasma está asociada a lipoproteínas y su distribución en ellas se realiza de forma paralela a la de otros lípidos [206-208]. En ratas, el  $\alpha$ -tocoferol se distribuye de forma más o menos equitativa entre las lipoproteínas de muy baja densidad (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) y las HDL [174], mientras que en humanos, la fracción de las LDL es la que contiene la mayor proporción de  $\alpha$ -tocoferol [207]. Esta distribución puede estar modulada por el tipo de ácidos grasos de la dieta, pues se ha demostrado que en las LDL de monos que tomaban una dieta rica en ácidos grasos saturados había menos  $\alpha$ -tocoferol que cuando tomaban dietas ricas en ácidos grasos mono y poliinsaturados, aunque el contenido total de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma no era significativamente diferente [209].

### 1.3.2 Incorporación a VLDL: $\alpha$ -TTP

Catignani y Bieri demostraron en 1977 la existencia de una proteína hepática que unía al  $\alpha$ -tocoferol [210]. Posteriormente, se demostró que esta proteína facilita la transferencia del tocoferol citosólico a lisosomas, microsomas y mitocondrias [207, 211-213] y que en este proceso discrimina entre los distintos tocoferoles, reconociendo preferentemente al  $\alpha$ -tocoferol [211]. Inicialmente se denominó  $\alpha$ -TBP (de  *$\alpha$ -Tocoferol Binding Protein*) y posteriormente, cuando su función como transferidora de  $\alpha$ -tocoferol hacia las partículas de VLDL recién sintetizadas fue claramente identificada,  $\alpha$ -TTP (de  *$\alpha$ -Tocoferol Transfer Protein*).

Una vez que los remanentes de quilomicrones llegan al hígado, son hidrolizados en el interior de los lisosomas. La  $\alpha$ -TTP reconoce y transporta el *RRR*- $\alpha$ -tocoferol de los lisosomas al retículo endoplásmico, para su incorporación a las VLDL nacientes [175, 214, 215], mediante un mecanismo que parece no depender del aparato de Golgi, sino que podría ser una nueva ruta asociada al metabolismo o transporte del colesterol [216]. Como ya se ha indicado, recientemente ha sido postulada una posible conexión entre la vitamina E y la síntesis de colesterol

basada en la homología de secuencias de la  $\alpha$ -TTP y el SPF, que estimula la conversión de escualeno a lanosterol en la síntesis de colesterol, mediante mecanismos desconocidos que promueven la transferencia de escualeno entre compartimentos intracelulares. Esta homología de secuencias identifica al SPF como TAP que podría actuar también como un factor de transcripción asociado a  $\alpha$ -tocoferol [88].

El resultado del paso de la vitamina por el hígado es que la  $\alpha$ -TTP discrimina entre las distintas formas de vitamina E procedentes de la dieta y es esencial para que el  $\alpha$ -tocoferol vuelva al plasma en las VLDL. De hecho, en ratones modificados genéticamente que no expresan esa proteína, o en pacientes que no la tienen por una enfermedad congénita, la excreción de todas las formas de vitamina E es similar [217-219], mientras que, en situaciones normales, el *RRR*- $\alpha$ -tocoferol recircula por el organismo y todas las demás formas de vitamina E (estereoisómeros, otros tocoferoles o tocotrienoles), incluyendo un exceso de  $\alpha$ -tocoferol, son excretados en la bilis. Esta selección preferencial del *RRR*- $\alpha$ -tocoferol permite además explicar las diferencias en la actividad biológica de cada una de las formas de vitamina E [220].

De esta forma, la  $\alpha$ -TTP regula los valores de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, manteniéndolos dentro de un estrecho rango. Por ello, en pacientes con ausencia de esta proteína, los valores plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol son muy bajos [175]. A su vez, en sujetos sanos a los que se administran por vía oral cantidades de hasta 100 veces los requerimientos normales de vitamina E, la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol aumenta sólo de 2 a 4 veces los valores normales [185, 221, 222]. La desaparición del  $\alpha$ -tocoferol del plasma es mucho más rápida cuanto mayor sea la dosis de vitamina E administrada, lo que sugiere que la  $\alpha$ -TTP está implicada en mantener los niveles de vitamina E constantes en respuesta a los suplementos de vitamina E [31].

Además de controlar el destino del tocoferol de los remanentes de quilomicrones, la  $\alpha$ -TTP interviene en el destino del tocoferol que llega al hígado asociado a otras lipoproteínas plasmáticas, como las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), HDL y LDL. A través de este mecanismo, el  $\alpha$ -tocoferol "viejo", el exceso de  $\alpha$ -tocoferol que se haya ingerido y las otras formas de tocoferol que lleguen al hígado (como el  $\gamma$ -tocoferol) son excretados por vía biliar [175].

Aunque se pensaba que la  $\alpha$ -TTP sólo se expresaba en hígado, se ha demostrado que también cumple un importante papel en el desarrollo normal de la placenta en ratones [223]. Su secuencia de cDNA fue clonada, primero en la rata [224] y posteriormente en el hombre [225]. En un principio se encontró que la expresión de su mRNA no era dependiente de los cambios en la disponibilidad de vitamina E [226], pero recientemente se ha publicado que su expresión sí podría estar modulada por la deficiencia en la dieta de vitamina E y proteínas [226, 227].

Una vez seleccionado por la  $\alpha$ -TTP en el hígado, el  $\alpha$ -tocoferol y los componentes lipídicos que han llegado derivados de la dieta en forma de remanentes de los quilomicrones se unen a los

glicéridos formados de la esterificación de los productos de la lipólisis del tejido adiposo (ácidos grasos y glicerol) y a los de síntesis endógena (triglicéridos, fosfolípidos y colesterol). De esta forma, el  $\alpha$ -tocoferol es secretado por las células hepáticas asociado con las VLDL, que constituyen el principal vehículo de secreción del  $\alpha$ -tocoferol [228].

### 1.3.3 Captación tisular de vitamina E

Las VLDL, una vez han madurado por el intercambio de componentes con las HDL [202], son parcialmente delipidadas por la LPL, que, como en el caso de los quilomicrones, hidroliza los triglicéridos que transporta. El  $\alpha$ -tocoferol que ha sido secretado por el hígado, puede tener entonces diferentes destinos [175]: parte del  $\alpha$ -tocoferol de las VLDL puede ser transferido a HDL durante la lipólisis; y parte del  $\alpha$ -tocoferol en VLDL termina en LDL durante el metabolismo de las VLDL. Las partículas remanentes de VLDL (o lipoproteínas de densidad intermedia, IDL, *Intermediate Density Lipoprotein*) pueden seguir dos alternativas: aproximadamente la mitad pueden ser captadas por el hígado, mientras que la otra mitad es convertida en LDL. A su vez, tras la acción de la LPL, una parte sustancial de los componentes de superficie de las VLDL es transferida a las HDL, igual que ocurría en el metabolismo de los quilomicrones. Consecuentemente, el  $\alpha$ -tocoferol que es segregado del hígado en forma de VLDL puede seguir varias vías alternativas: una determinada proporción puede continuar en el centro de las partículas de las VLDL cuando éstas son transformadas en LDL, otra vuelve al hígado en forma de IDL y finalmente otra parte es transferida a las HDL en el proceso de hidrólisis de las VLDL por la LPL. De esta forma, el  $\alpha$ -tocoferol segregado a la circulación en forma de VLDL puede dar lugar a su enriquecimiento en todas las lipoproteínas circulantes [229].

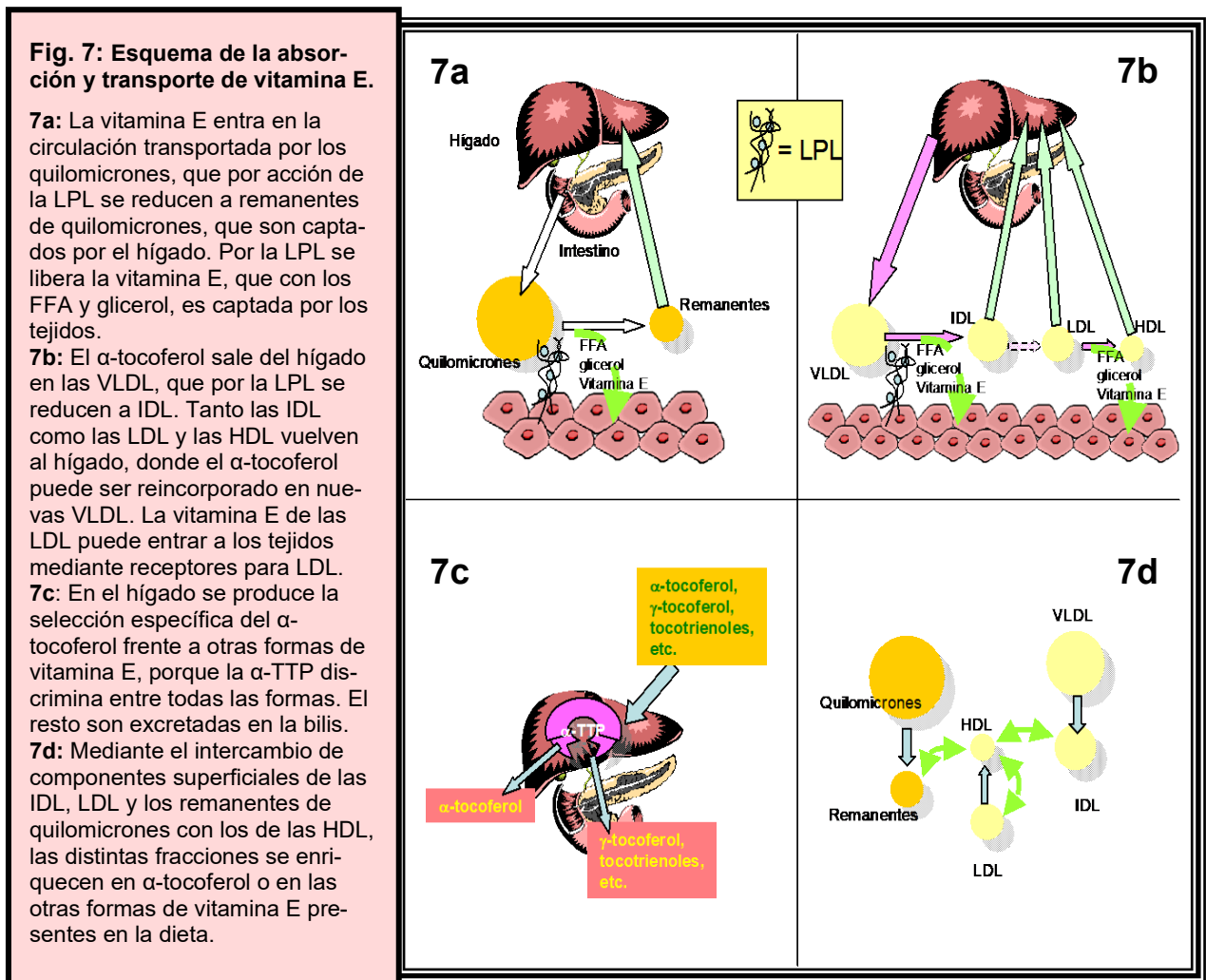
Parte del  $\alpha$ -tocoferol asociado con los quilomicrones y VLDL es probablemente transferido a las células de tejidos periféricos y a HDL durante la lipólisis ejercida por acción de la LPL. Los tejidos extrahepáticos reciben vitamina E desde los quilomicrones y otras lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL) [230]. En este proceso, la LPL tiene un papel muy importante, pues se ha demostrado que hay niveles mayores de  $\alpha$ -tocoferol en músculo esquelético de ratones transgénicos que sobreexpresan la LPL en este tejido [231] y pacientes con una deficiencia en LPL presentan valores circulantes de  $\alpha$ -tocoferol en las lipoproteínas ricas en triglicéridos del orden de 10 veces más altos de lo normal [232] y un bajo contenido en  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo [233, 234].

Las LDL son captadas por las células por un mecanismo dependiente de receptor [235]. La captación de vitamina E por parte de los tejidos también está relacionada con la actividad de los receptores de LDL [236] y esta adquisición mediada por receptor resulta cuantitativamente importante para determinados tejidos tales como las glándulas suprarrenales, los ovarios y el



tejido adiposo. Cabe también indicar que entre los tejidos que presentan una mayor proporción de receptores de LDL se encuentran el hígado y el intestino [237], pero se sabe que los conejos Watanabe, que tienen deficiencia en la actividad de dicho receptor, presentan unos valores tisulares de  $\alpha$ -tocoferol dentro de la normalidad [238], lo cual significa que existen mecanismos alternativos para la llegada del  $\alpha$ -tocoferol a los tejidos. A su vez, recientemente en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que alrededor del parto en la rata, mientras que la actividad LPL en glándula mamaria controla la captación de  $\alpha$ -tocoferol, éste no es el caso en tejido adiposo, donde debe de haber otro mecanismo de llegada de la vitamina E [191].

En la Fig. 7 se resumen y esquematizan las fases principales en el metabolismo de la vitamina E.



### 1.3.4 Vitamina E y lípidos de la dieta

En los últimos años se ha ido acumulando evidencia de que un descenso en el consumo total de grasa, con un incremento en la ingesta de ácidos grasos mono y poliinsaturados a expensas del consumo de ácidos grasos saturados, tiene numerosos efectos positivos para la salud. Cada vez hay mayor apoyo experimental y epidemiológico de que el consumo de pescado y de aceite de pescado que contenga PUFA  $\omega$ -3, es beneficioso para la prevención de enfermedades cardiovasculares [239] y posiblemente para el cáncer [240]. Los aceites de pescado han demostrado un efecto hipolipemiante disminuyendo los triglicéridos totales en la sangre y también pueden tener efectos antitrombóticos [239].

Sin embargo, un exceso del consumo de PUFA, es decir, de los ácidos grasos esenciales linoleico y  $\alpha$ -linolénico y de sus derivados de cadena más larga ( $C_{20:5\omega-3}$ , EPA -eicosapentaenoico- y  $C_{22:6\omega-3}$ , DHA -docosahexaenoico-), puede tener consecuencias sobre los requerimientos de vitamina E. La relación entre la vitamina E y el consumo en la dieta de los PUFA ha sido descrito a menudo cualitativamente y existe una clara evidencia de que los requisitos de vitamina E aumentan con la cantidad y grado de insaturación de los PUFA que se ingieren [241-247]. De hecho, un dato frecuentemente encontrado en la literatura es el que una dieta rica en pescado o en aceite de pescado disminuye la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en distintos tejidos, tanto en humanos como en ratas [248-251]. Incluso, alimentar a animales con aceite de pescado ha sido un método clásico para inducir una deficiencia de vitamina E en animales [252], e históricamente se ha considerado que cuando la dieta contiene una alta cantidad de PUFA es necesario incrementar el consumo de vitamina E para así prevenir los efectos de la peroxidación lipídica. Así, ya en 1963, Harris y Embree propusieron que la dieta debía aportar 0.6 mg de  $\alpha$ -tocoferol por cada gramo de ácido linoleico [243] y este valor ha sido posteriormente revisado para tener en cuenta la presencia en la dieta de otros ácidos grasos con distinto grado de insaturación y llegar a fijar los requerimientos de vitamina E en la dieta en función de una ecuación que los relaciona con los gramos ingeridos diarios de cada tipo de ácidos grasos poliinsaturados [253].

Sin embargo, la cantidad precisa de vitamina E necesaria para compensar la demanda incrementada causada por los PUFA de la dieta no ha sido investigada sistemáticamente en el hombre y los requerimientos de vitamina E en función de la ingesta de PUFA deben ser extrapolados a partir de los datos obtenidos en animales.

#### 1.3.4.1 *Peroxidación lipídica asociada a la dieta*

Un posible efecto adverso de la ingesta elevada de PUFA en la dieta es que su acumulación en los tejidos puede convertirlos en más susceptibles a la peroxidación lipídica (v. apdo. 1.2.2.1.1),

especialmente si la peroxidación supera los mecanismos antioxidantes normales. De hecho, una ingesta elevada de PUFA sin protección antioxidante adecuada podría derivar en un aumento de radicales libres y de productos finales de peroxidación.

Se han realizado numerosos estudios para investigar el efecto sobre los niveles de vitamina E y el grado de peroxidación lipídica cuando se aumenta la ingesta de los ácidos grasos EPA y DHA, en forma de suplementos comerciales de aceite de pescado. Se ha observado que en estas condiciones aumentan los niveles de productos de peroxidación lipídica, pero no está claro que un aumento paralelo en la ingesta de vitamina E pueda prevenir la aparición de estos productos [254-256]. Se han revisado recientemente 7 estudios en humanos con distintas ingestas de PUFA y de vitamina E, que llegan a resultados que podrían parecer contradictorios, pero cuya inconsistencia podría deberse también a los métodos empleados para determinar la peroxidación lipídica [249].

En consecuencia, hacen falta más estudios que demuestren de forma consistente el grado de peroxidación lipídica que pueda producirse por la ingesta de PUFA en la dieta, en qué medida depende del tipo y cantidad de PUFA, si esa peroxidación podría ser prevenida por la vitamina E y si fuera así, qué cantidad de vitamina E sería necesaria para prevenirla.

### **1.3.5 Lípidos, estrés oxidativo y vitamina E al final de la gestación, en el feto y el recién nacido.**

#### *1.3.5.1 Metabolismo lipídico en la gestación*

Durante la gestación, a pesar de la alimentación intermitente de la madre, ésta tiene que aportar de forma continua nutrientes al feto. Para soportar esta extracción de sustratos, la madre debe adaptar su propio metabolismo. Uno de los parámetros más afectados es el metabolismo lipídico, a pesar de que con excepción de los cuerpos cetónicos y los FFA, la placenta es prácticamente impermeable a los lípidos [257, 258].

Durante los dos primeros tercios de la gestación, coincidiendo con el mínimo incremento del peso del feto, la madre conserva una gran proporción de los nutrientes que ingiere. Ello, unido a su hiperfagia, da lugar a un incremento del peso de sus propias estructuras, lo cual es especialmente manifiesto en el acúmulo de grasas de depósito [259, 260]. La disponibilidad de depósitos grasos suficientes en la madre resulta imprescindible para sostener la aumentada actividad lipolítica de su tejido adiposo en el último tercio de la gestación. De estudios en la rata gestante, se sabe que el acúmulo de grasas corporales durante los dos primeros tercios de la gestación se logra a expensas de tres cambios importantes; hiperfagia [261], incremento de la actividad lipogénica en tejido adiposo [262, 263] y aumento de la actividad de la lipoproteína

lipasa [257]. El papel crítico que tienen estos cambios en el metabolismo materno y sus consecuencias en el desarrollo fetal se pone de manifiesto por el hecho de que condiciones que impiden el acúmulo de grasas durante la primera mitad de la gestación, reducen el activo catabolismo materno durante el último tercio y, lo que es más importante, afectan al normal crecimiento del feto [262, 264, 265].

En la última parte de la gestación, el rápido crecimiento fetal se sostiene por la intensa transferencia de nutrientes a partir de la circulación materna. Esto da lugar a un cambio en el metabolismo materno, que se pone de manifiesto por un activo catabolismo, especialmente evidente en su tejido adiposo [266, 267] y que llega a estar acelerado cuando disminuye la ingesta [266]. En el tejido adiposo disminuye la lipogénesis, al tiempo que, como consecuencia del aumento en la expresión molecular y actividad de la lipasa sensible a hormonas (HSL, *Hormone Sensitive Lipase*) [268], aumenta la actividad lipolítica. El acúmulo de triglicéridos en el tejido adiposo materno disminuye como consecuencia de la disminución en la actividad de la LPL [269]. A su vez, el rápido e intenso incremento en la actividad de la LPL de glándula mamaria, junto con la disminución de la LPL de tejido adiposo, dirige a los triglicéridos circulantes hacia su captación por la glándula mamaria para la producción de leche [270-273].

La mayor parte de los cambios que se producen en el metabolismo de lipoproteínas durante la gestación son inducidos por las modificaciones hormonales que normalmente tienen lugar, entre las que destacan dos: la resistencia insulínica y el aumento de estrógenos. La resistencia insulínica que normalmente se produce durante el último tercio de la gestación contribuye, o es incluso responsable, de la aumentada actividad lipolítica del tejido adiposo y de la disminución en la actividad LPL de este mismo tejido [274].

Además, se sabe que los estrógenos son responsables del incremento en la secreción hepática de las VLDL y reducen la actividad y la expresión molecular de la lipasa hepática (*Hepatic Lipase*, HL), habiéndose propuesto que contribuyen activamente a los cambios de lipoproteínas que se producen en la gestación [275]. En conclusión, la resistencia insulínica y el alto nivel de estrógenos son responsables no sólo de la mayor producción hepática de las VLDL sino también de una disminuida eliminación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de la circulación. En consecuencia, el aumento en la producción hepática de VLDL-triglicéridos y una disminución de su aclaramiento debido a la reducción que se observa en el último tercio de la gestación en la actividad de LPL en tejido adiposo, resultan ser los principales factores responsables del incremento en plasma de VLDL-triglicéridos durante la gestación.

El resultado de estos cambios hormonales es que a lo largo de la gestación se produce de forma constante un incremento en los niveles plasmáticos de triglicéridos, que se corresponde con un enriquecimiento en triglicéridos en todas las fracciones lipoproteicas, aunque el aporte

más importante a la hiperlipidemia se debe al acúmulo de VLDL-triglicéridos [276]. Estas lipoproteínas se sintetizan en el hígado, a partir de los lípidos sintetizados en el propio hígado o provenientes de los productos de la lipólisis del tejido adiposo. Todos estos cambios han sido exhaustivamente revisados previamente [272, 277, 278].

### **1.3.5.2 Estrés oxidativo en la gestación**

La gestación es un estado fisiológico que se acompaña de una alta demanda metabólica, pues el metabolismo basal puede incrementarse en un 20% [279]. Los tejidos aumentan su consumo de oxígeno entre un 20 y 30% [279] y esto incrementa a su vez la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [280]. Las mujeres gestantes tienen más estrés oxidativo y productos de peroxidación lipídica que las no gestantes [281], incremento que suele ir acompañado de un aumento también en las defensas antioxidantes [280], que no es suficiente para compensar el mayor estrés oxidativo. En las ratas, la peroxidación lipídica en el cuerpo lúteo permanece baja hasta la mitad de la gestación y empieza a elevarse tras el día 15 [282, 283], asociada también a cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes maternas, como la superóxido dismutasa (SOD) [284] y un descenso cuantificable en la glutatión peroxidasa en el hígado y la placenta de ratas gestantes [283]. También se ha demostrado que ratas a las que se les extirpa la glándula pineal y que por tanto no pueden sintetizar los indoles pineales que han sido asociados a actividad antioxidante, presentan mayores índices de peroxidación lipídica [285].

De manera similar, la cantidad de peróxidos lipídicos que se producen principalmente en la placenta [286], están aumentados en la sangre de mujeres embarazadas [287]. De hecho, la placenta es una fuente importante de estrés oxidativo, pues es rica en PUFA, que dan lugar a peróxidos lipídicos que se secretan a la circulación materna. En la gestación normal, esta producción se mantiene bajo control mediante las enzimas antioxidantes presentes en la propia placenta: SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S-reductasa [281].

Condiciones que desencadenen desviaciones en la hiperlipemia de la gestante que aumenten la susceptibilidad a la oxidación de los lípidos circulantes pueden producir efectos negativos. Así, cambios dietéticos, un intenso ejercicio, o la diabetes gestacional pueden disminuir las reservas antioxidantes y/o el grado de estrés oxidativo [271].

### **1.3.5.3 Lípidos en la dieta durante la etapa perinatal**

Los PUFA de cadena larga o LC-PUFA (*Long Chain PUFA*) se sintetizan a partir de los ácidos grasos esenciales ingeridos en la dieta, el ácido linoléico ( $C_{18:2\omega-6}$ ) de la serie  $\omega-6$  y el  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18:3\omega-3}$ ) de la serie  $\omega-3$  [288]. Los LC-PUFA predominantes en la leche y tejidos humanos son el ácido araquidónico (AA,  $C_{20:4\omega-6}$ ) y el DHA [289]. La síntesis endógena de

LC-PUFA a partir de los precursores de la dieta ocurre desde los primeros días de la vida extrauterina, pero existe una variabilidad interindividual en la proporción en que se produce esa síntesis en los bebés prematuros y a término [290, 291]. El aporte de ácido linoléico y de  $\alpha$ -linolénico modula la síntesis de AA y de DHA [292-294]. Sin embargo, la contribución de la síntesis endógena a partir de  $\alpha$ -linolénico al total de DHA en sangre y tejidos de niños no iguala al aporte de DHA proveniente de la dieta [295-301].

En el cerebro humano y en otros tejidos se depositan cantidades considerables de AA y DHA durante el crecimiento intrauterino y postnatal [296]. El DHA de la dieta materna aumenta el DHA fetal e infantil más eficazmente que su precursor, el ácido  $\alpha$ -linolénico, tanto en humanos como en primates [297, 299]. A su vez, el contenido en DHA del cerebro fetal e infantil se ve más afectado por la dieta que el contenido en AA [297, 299]. En promedio, el feto en el tercer trimestre acumula aproximadamente de 40 a 60 mg de LC-PUFA  $\omega$ -3 por cada kg de peso corporal cada día [296]. Independientemente del periodo de gestación, existe una variabilidad interindividual muy grande en los niveles de DHA en los recién nacidos humanos. Esta variabilidad puede deberse a diferencias en el aporte o en el metabolismo de los ácidos grasos, u otros factores que influyen en el desarrollo intrauterino, o las limitaciones metodológicas. Comparado con los bebés a término, los prematuros tienen más riesgo de tener insuficiente acúmulo de LC-PUFA debido a la interrupción del aporte placentario [302, 303].

Se ha postulado que la gestación incrementa la demanda de LC-PUFA debido a las necesidades del crecimiento fetal y la expansión de los tejidos maternos. Fuentes potenciales para aportar LC-PUFA al feto incluyen los depósitos maternos, la dieta durante la gestación y la síntesis endógena de LC-PUFA a partir de los ácidos grasos esenciales, aunque hay que tener en cuenta que hay una transferencia placentaria preferente de LC-PUFA frente a los ácidos grasos precursores [304, 305]. Asimismo, los estudios muestran una variación de 3 a 4 veces en los niveles plasmáticos de LC-PUFA entre las mujeres gestantes de la misma población y se ha observado que esta variabilidad afecta también al recién nacido [306].

La concentración de ácidos grasos de la leche está relacionada con la de la dieta materna, con la composición de ácidos grasos del plasma, la concentración de grasa en la leche, duración de la lactancia y otros factores [289, 307-309]. Se ha estimado que alrededor de un 30% de los ácidos grasos de la leche materna en humanos provienen directamente de los de la dieta materna, mientras que la porción principal deriva directamente de los depósitos maternos [310]. Sin embargo, el contenido en DHA de la leche materna es más variable y la influencia de la dieta materna en el contenido en DHA de la leche es mayor que el observado con el AA [289].

Existen numerosos estudios que demuestran que el DHA juega un papel esencial en el desarrollo del sistema visual y nervioso (para una revisión más exhaustiva sobre el tema, ver [311]).

La deficiencia en DHA durante la etapa perinatal se ha estudiado que está asociada a electroretinogramas alterados y un peor aprendizaje en roedores y primates no humanos [312, 313], mientras que la suplementación con 300 mg de DHA por cada 100 g de dieta ingerida por la madre durante la etapa fetal y postnatal mejoró la capacidad de aprendizaje de ratas durante los primeros días post-parto [314].

Se ha llegado a determinar que el aporte mínimo necesario de ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido graso esencial precursor del DHA) a ratas en desarrollo (post-lactantes) está alrededor de un 0.4% de la energía total de la dieta (200 mg por cada 100 g de dieta), con una proporción linoléico/ $\alpha$ -linolénico de 6 [315]. En la dieta de la madre lactante se encontró también como necesaria esa misma proporción [316], mientras que durante la gestación en la rata, el aporte mínimo necesario que se ha propuesto es de unos 400 mg de  $\alpha$ -linolénico por cada 100 g de dieta (un 0.9% de la energía total) y una proporción de linoléico/ $\alpha$ -linolénico de 3 [316]. Cabe también indicar que en este mismo estudio se concluye que 800 mg por cada 100 g de dieta es un aporte innecesario, aunque no se encontró ningún efecto negativo.

#### ***1.3.5.4 Vitamina E en la gestante, el feto y el recién nacido***

Aunque la vitamina E es esencial para mantener la gestación en la rata, este papel no se ha demostrado en la mujer, posiblemente porque en ésta no se produce de forma espontánea una deficiencia tan intensa como en animales de experimentación sometidos a dietas especiales. Al igual que ocurre en el adulto, el feto también necesita disponer de una adecuada reserva de antioxidantes para combatir el daño que pueda producirle la formación de radicales libres por procesos oxidativos. Aunque el feto es sustancialmente hipóxico, durante la vida fetal, la gestación, el parto y la etapa postnatal se producen episodios de hipoxia e isquemia/reperfusión que deben ser combatidos por el aporte de suficientes reservas de antioxidantes [317].

Como ya se ha indicado, los lípidos en plasma aumentan progresivamente en la circulación materna a medida que avanza el embarazo y este cambio corresponde a los valores de triglicéridos y en menor medida a los del colesterol, en todas las lipoproteínas circulantes [276]. A su vez, este incremento de los lípidos circulantes se realiza en paralelo a un incremento de vitamina E en plasma, de forma que el cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales se mantiene por encima de 0.8 [317]. A pesar de ello, en la gestante se produce una tendencia a disminuir el contenido de vitamina E en los eritrocitos, alcanzando al final del embarazo valores de franca deficiencia [318], lo que indica que los valores plasmáticos de tocoferol aumentan al final de la gestación a expensas de su contenido en eritrocitos.

El paso de vitamina E a través de la placenta, al igual que el de otros componentes lipídicos, se realiza mediante difusión simple, a favor de gradiente de concentración. Este transporte se realiza de forma que disminuye con el tamaño molecular y con la hidrosolubilidad del compuesto

[319-321] y en el caso de la vitamina E es ciertamente escaso [322-325], del orden de un 10% del de la L-glucosa [326]. Una dependencia del paso de vitamina E de la madre al feto se evidencia por la relación directa que existe entre los valores de  $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos de la madre y del feto, con valores siempre inferiores en el segundo [317]. Esta situación de deficiencia de vitamina E se mantiene en el recién nacido, en el que se ha demostrado una disminuida resistencia a la hemólisis inducida por peróxido de hidrógeno [327, 328]. Esto se debe no sólo a la menor proporción de vitamina E, sino también al incremento de las necesidades de antioxidantes en el recién nacido y especialmente ante el incremento en la presión de oxígeno y el complemento de PUFA a que se encuentra normalmente sometido. La llegada de vitamina E al lactante se produce a través de la leche materna y precisamente la inducción de LPL que se produce normalmente en glándula mamaria alrededor del parto [260, 329] puede constituir un mecanismo esencial para garantizar la transferencia a la leche de la vitamina E que circula en la sangre materna asociada a las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

### 1.3.6 Lípidos, estrés oxidativo y vitamina E en la IDDM.

La diabetes tipo I o IDDM (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) en humanos se ha definido como una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y, por ello, ausencia de insulina circulante [330].

Para estudiar la IDDM es ya clásico el modelo animal de ratas tratadas con estreptozotocina (STZ), droga que causa un daño oxidativo [331] y la muerte celular específicamente en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, por lo que animales a los que se administra esta droga tienen los síntomas de la IDDM en pocos días [332].

#### 1.3.6.1 Metabolismo lipídico en la IDDM

Uno de los síntomas clínicos más comunes de este tipo de diabetes es una acusada hiperlipidemia cuando el control metabólico es pobre. Esta hiperlipidemia se caracteriza por una acusada hipertrigliceridemia acompañada de niveles normales o sólo ligeramente elevados de colesterol [333]. El enriquecimiento en triglicéridos se produce principalmente en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones) [334], porque hay un aumento en la cantidad de FFA que llegan al hígado, donde pueden ser reesterificados y pasan a formar parte de nuevas VLDL que salen a la circulación. Además, dado que en ratas ayunadas con IDDM inducida por STZ, la secreción hepática de VLDL es menor que en ratas controles en las mismas condiciones [334], la hipertrigliceridemia se ha atribuido también a un menor aclaramiento de las VLDL del plasma.

En la IDDM no controlada, la actividad LPL del miocardio es menor, asociada a una menor ac-



tividad de LPL post-heparínica [335, 336] y todo ello supone una disminución en la degradación de las VLDL [335]. Este efecto inhibitor de la diabetes sobre la actividad LPL no se debe a una disminución de los sitios de unión a heparán sulfato en el endotelio [337]. En cardiomiocitos aislados de corazones de ratas con diabetes aguda, tanto la actividad LPL celular como la post-heparínica están disminuidas con tan sólo una pequeña disminución en la masa de proteína LPL; como resultado, la actividad específica es menor, sugiriendo que existen acontecimientos postraduccionales que suponen una acumulación de proteína LPL inactiva [338]. La IDDM disminuye también la actividad LPL del tejido adiposo, fundamentalmente porque disminuye la actividad específica de la enzima, aunque durante la diabetes inducida por STZ también se ha demostrado una menor cantidad de mRNA y una menor cantidad de enzima [339].

El conjunto de factores que conducen a la reducción de la actividad LPL durante la diabetes no está claro, pues pueden estar implicados cambios en la disponibilidad de sustrato y/o en los niveles hormonales. Aunque la administración *in vivo* de insulina a ratas diabéticas rápidamente revierte la disminución en la actividad LPL del miocardio, la insulina no estimula la LPL cuando es añadida *in vitro* a cardiomiocitos de ratas, controles o diabéticas [336, 338, 340], por lo que existen factores adicionales *in vivo* que deben actuar junto con la insulina para estimular la actividad LPL. En este sentido, la combinación de dexametasona e insulina se ha demostrado que tiene un efecto estimulador tanto sobre la LPL celular como sobre la LPL post-heparínica de cardiomiocitos de ratas controles [341] y de diabéticas [342, 343], mientras que la insulina sola no tiene ningún efecto.

No obstante, la disminución en la actividad LPL puede no ser suficiente para justificar la hipertrigliceridemia. Como ya se ha indicado, los remanentes de quilomicrones son aclarados menos eficazmente de la circulación en la situación de diabetes [344], lo que parece indicar que estos remanentes y los de VLDL (IDL) son captados más lentamente vía mecanismos asociados a receptores. De hecho, se ha demostrado que en ratas tratadas con STZ hay una reducción de un 50% en los receptores de LDL en tejido adiposo epididimal y de un 80% en el mRNA del receptor LDL en el mismo tejido [345].

Además, hay que tener en cuenta que en ausencia de insulina la vida media de las VLDL circulantes aumenta [330], debido principalmente a la menor actividad de la LPL. Al estar más tiempo en circulación y al encontrarse en situación de hiperglucemia, aumentan las posibilidades de que las apoproteínas de las distintas lipoproteínas estén glicosiladas, lo que también dificulta su reconocimiento por los distintos receptores y retrasa su aclaramiento [346, 347]. De hecho, se ha descrito que las VLDL de diabéticos son más resistentes a la acción de la LPL que las VLDL normales [348].

### 1.3.6.2 Estrés oxidativo en la IDDM

En los últimos tiempos se han ido acumulando evidencias de que los radicales libres que se puedan originar cuando la concentración de glucosa circulante está elevada participan en el desarrollo de la diabetes y en sus complicaciones asociadas [349-353]. Por otra parte, se ha observado un descenso en la capacidad antioxidante total del plasma de pacientes diabéticos [354-365] y hay varios estudios clínicos que muestran en la IDDM aumentos en los niveles de diversos marcadores de estrés oxidativo (TBARS, hidroperóxidos, 8-IP, 8-OHdG, LDL oxidadas...) [354, 355, 366-375]. En los pacientes con IDDM, cuando alcanzan un adecuado control metabólico, los niveles de estos marcadores disminuyen [376]. A su vez, en ratas diabéticas por inyección de STZ se han observado también los mismos procesos e incrementos en los marcadores de estrés oxidativo [377, 378].

De esta forma, se puede afirmar que está establecida la opinión de que en los pacientes diabéticos hay un incremento del estrés oxidativo [379]. Esta situación se puede producir bien porque la formación de radicales libres (y de otras especies reactivas de oxígeno, ROS) esté aumentada en los pacientes diabéticos [380], bien porque las defensas antioxidantes están disminuidas [381, 382], o por una combinación de ambos cambios.

Este estrés oxidativo resulta ser responsable de complicaciones en el diabético, fundamentalmente cardiovasculares y también polineuropatías [379]. La mejor terapia para evitar estas complicaciones asociadas al estrés oxidativo es el control metabólico, pues en pacientes con IDDM que presentan un aumento de la excreción urinaria de 8-IP, se puede llegar a normalizar esa excreción mediante un riguroso control metabólico [372]. A su vez, entre los tratamientos propuestos para disminuir el estrés oxidativo en la diabetes está la terapia antioxidante. Se ha demostrado en varios estudios que el plasma total y las LDL aisladas de diabéticos son más susceptibles a la peroxidación que sujetos sanos y que la suplementación con *RRR*- $\alpha$ -tocoferol disminuye los procesos de peroxidación en pacientes diabéticos [222, 383-385]. Los efectos beneficiosos de la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol o con ácido  $\alpha$ -lipoico disminuyendo el estrés oxidativo se han estimado mediante la medida de los hidroperóxidos o la oxidación de LDL [385, 386]. A pesar de que marcadores de estrés oxidativo tales como el daño en DNA, lípidos y proteínas apoyan la idea de un aumento del estrés oxidativo en la diabetes y de que una terapia antioxidante puede mejorar esta situación [387, 388], la severidad de la diabetes o de las lesiones asociadas a la diabetes no se correlacionan directamente con parámetros del estrés oxidativo, como son los TBARS [389, 390]. Además existen incluso estudios sobre pacientes diabéticos en los que no se encuentran variaciones en los marcadores de estrés oxidativo (8-IP y MDA) y en los que los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol corregidos por lípidos son incluso más altos en los pacientes diabéticos que en los sujetos controles [391].

### 1.3.6.3 *Lípidos en la dieta de diabéticos tipo I*

Las dietas ricas en aceite de pescado se han usado para el tratamiento de la diabetes, pero sobre todo en la diabetes tipo II (No Insulinodependiente) porque mejoran la tolerancia a la glucosa y, sobre todo, porque disminuyen la hiperlipidemia [392]. Así pues, este tratamiento puede disminuir el riesgo elevado que tienen los enfermos de diabetes de padecer enfermedades cardiovasculares [393]. Además, se han demostrado efectos beneficiosos de esta dieta sobre el daño renal [394], reduciendo la albuminuria [392, 395] y mejorando la función renal [395] y la presión arterial [392]

La terapia de aceite de pescado disminuye los triglicéridos totales en plasma, la concentración de VLDL y la concentración de triglicéridos en las VLDL [396-405]. Ello es consecuencia de una disminución en la síntesis y secreción hepática de VLDL [406] y una mayor eliminación de estas lipoproteínas por aumento de la LPL [407]. A su vez, el enriquecimiento con aceite de pescado de la dieta de ratas aumenta significativamente la actividad del receptor LDL en hígado y revierte el efecto inhibitor de las grasas saturadas sobre la función del receptor LDL [408, 408].

Existen algunos estudios en los que se encontró que los aceites de pescado mejoran la sensibilidad insulínica tanto en humanos [409] como en ratas [410], que sugieren que su efecto puede estar relacionado con la captación por el músculo esquelético de la glucosa plasmática. A ratas diabéticas por STZ se les administró por vía intravenosa una emulsión de DHA, y, aunque no se encontraron variaciones en la sensibilidad insulínica, disminuyeron los niveles de glucosa plasmática en ayunas [411].

### 1.3.6.4 *Vitamina E en la IDDM*

Las variaciones en el metabolismo y distribución tisular de la vitamina E durante la diabetes no han sido tan estudiadas como el posible efecto beneficioso de esta vitamina en la aparición y evolución de la diabetes y en el desarrollo de las patologías asociadas.

Los niveles plasmáticos de vitamina E tienden a aumentar en los animales experimentales con diabetes, tanto en los genéticamente diabéticos como en los que lo son por la administración de alguna droga [382, 412-416]. Este es también el caso en humanos, en los que se ha observado consistentemente un incremento en los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol en los pacientes diabéticos [414, 417-424]. A la vez, en los eritrocitos de diabéticos se ha encontrado que la vitamina E está disminuida [419, 421]. En ratas espontáneamente diabéticas (BB), los altos niveles de vitamina E en plasma disminuían hasta alcanzar valores normales mediante el tratamiento con insulina, lo que sugiere que los niveles elevados de  $\alpha$ -tocoferol eran consecuencia del estado diabético y que la variabilidad en los niveles plasmáticos de vitamina E pueden estar asociados al grado de hiperlipidemia [414]. Sin embargo, también se ha descrito que los niveles

de  $\alpha$ -tocoferol en plasma disminuyen [425] o no varían [426], en diabetes experimentales menos severas.

En distintos tejidos estos cambios no son tan consistentes [427]. Así, en el hígado de ratas diabéticas por STZ se han encontrado concentraciones elevadas de  $\alpha$ -tocoferol [382] y también en el corazón, hígado, riñón y músculo esquelético, mientras que no se han encontrado diferencias en el cerebro y pulmón [416]. En el suero, corazón, testículos y timo de ratas BB, también se encontraron concentraciones elevadas de  $\alpha$ -tocoferol [414].

## 1.4 Métodos de valoración de Vitamina E y productos relacionados

Los avances en el conocimiento del metabolismo y funciones de la vitamina E han corrido parejos al desarrollo de la metodología necesaria para su análisis. El desarrollo de las técnicas de separación, principalmente la cromatografía, ha permitido estudiar el metabolismo de las diferentes isoformas, su distribución en el organismo, las diferencias en la acción de los distintos estereoisómeros del  $\alpha$ -tocoferol, etc. A su vez, ha sido necesario también desarrollar la metodología necesaria para el correcto tratamiento de la muestra, previo al análisis. Una revisión exhaustiva de métodos para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol y productos relacionados puede encontrarse en el apéndice II de la presente Memoria.

### 1.4.1 Tratamiento de la muestra

Excepto en el caso del análisis de vitamina E en aceites, que pueden ser inyectados directamente en el sistema cromatográfico tras ser diluidos, la vitamina E debe ser extraída desde la matriz de la muestra y posteriormente concentrada. Esta vitamina no está unida químicamente a proteínas, lípidos o hidratos de carbono, por lo que usar reactivos y condiciones agresivas para liberarla, como la saponificación, no parece necesario. A pesar de esto, si no se emplean condiciones adecuadas para extraer a la vitamina E desde el medio lipofílico, las recuperaciones pueden ser muy pobres, ya que podría estar asociada a otros componentes de la matriz y debe ser liberada en el proceso de tratamiento de la muestra.

Los ésteres de tocoferol pueden ser hidrolizados para ser analizados como la forma libre, pero, en la mayor parte de los casos, no sería necesario modificar el proceso de tratamiento, sino simplemente tenerlo en cuenta a la hora de la separación cromatográfica.

En general, la muestra debe ser tratada con un disolvente orgánico para deshacer las estructuras a las que la vitamina E puede estar asociada (membranas, lipoproteínas, acúmulos de gra-

sa...), para eliminar posibles interferencias de otras moléculas grandes como proteínas o hidratos de carbono y para proporcionar un medio en el que los analitos puedan estar libres en disolución. Este disolvente orgánico es casi siempre etanol, pero también se ha empleado el metanol. El SDS como modificador para la preparación de la muestra fue propuesto por Burton *et al* [428] y ha sido posteriormente adoptado por muchos investigadores [142, 429-435].

La saponificación, tratamiento con una base fuerte en caliente (normalmente KOH en etanol o metanol) es un proceso frecuentemente utilizado, bien aplicado a toda la muestra, bien a una fracción lipídica previamente aislada. Tras la saponificación, los componentes insaponificables (la vitamina E entre ellos) son extraídos con otro disolvente orgánico más apolar. La saponificación es un proceso largo y complejo, que implica muchas precauciones, por lo que han sido evaluados los factores que pueden interferir en el proceso de saponificación-extracción [436]. Hay que reseñar que ya en 1979 se comprobó que la saponificación no era necesaria y los resultados no eran distintos de los que se obtenían mediante la extracción normal [437]. Desde entonces distintos equipos de investigación han aplicado métodos con o sin saponificación al mismo tipo de muestras.

Dado que la vitamina E es un antioxidante, para prevenir su oxidación en el proceso de análisis, se han empleado antioxidantes añadidos a la muestra en algún paso del proceso global, tanto si la muestra se iba a saponificar o no. Se han empleado BHT, pirogalol y ácido ascórbico, solos o en distintas combinaciones [429, 431, 438-450], pero, en general, en los métodos desarrollados para medir  $\alpha$ -tocoferol, la adición de antioxidantes ya no se considera necesaria y la mayoría de métodos se desarrollan sin la adición de estos. Los antioxidantes pueden ser importantes si se van a estudiar otros analitos más lábiles, o si se va a tratar con matrices especiales, o si la saponificación es una parte necesaria del tratamiento de la muestra. En cualquier caso, hay que añadir dos datos más: los antioxidantes no aseguran la recuperación del 100% del analito en la muestra, pues al menos un método, que emplea BHT, ascórbico y pirogalol, no consigue una recuperación superior al 86% [442] y se ha demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol es estable durante al menos 4 horas en las condiciones usuales del laboratorio [451] e incluso 4 semanas en extractos de muestras [452].

Los disolventes que se emplean para la extracción de la vitamina E incluyen el cloroformo:metanol 2:1 (v/v) que corresponde al método usual para la extracción de lípidos [453], la acetona, el dietiléter y los disolventes de la extracción mediante Soxhlet. Para facilitar la extracción, a las muestras húmedas se les puede añadir sulfato sódico o magnésico. Los disolventes empleados tienen que ser capaces de penetrar de manera eficaz en la muestra, por lo que la extracción suele realizarse mediante una agitación fuerte, o, como se propone en general en esta Memoria, mediante la sonicación con sonda de ultrasonidos.

El hexano es el disolvente más empleado para extraer la vitamina E de la muestra, solo o con pequeñas cantidades de disolventes más polares como el etanol o el acetato de etilo, o el diisopropiléter (nunca más del 5%, pues disminuye la miscibilidad). El hexano puede tener el inconveniente de que las fases no se mezclen verdaderamente bien y que la eficacia de la extracción no sea tan alta como con otros disolventes [454, 455], como el propanol [456], la acetona [457-459] o alguna otra mezcla de disolventes [455].

Para que las recuperaciones no se vean afectadas, se debe trabajar con un patrón interno. Un patrón interno es una sustancia que no existe en la muestra y cuyas propiedades físico-químicas son tan similares a las de los analitos de interés que se puede afirmar que se comportará en todos los procesos a los que se someta a la muestra de forma idéntica a la de las sustancias que se desean cuantificar, pero sin interferir en su determinación. El patrón interno se añade de forma controlada a las muestras y permite corregir los posibles errores asociados al tratamiento de la muestra. Para el análisis de  $\alpha$ -tocoferol, el 5,7-dimetiltocol [460-463] y el tocol (v. Fig. 2) están entre los patrones internos que mejor pueden cumplir estas características. El tocol fue uno de los patrones internos más empleados, pero en la actualidad no se encuentra fácilmente en casas comerciales [461, 464] y sólo se obtiene sintetizándolo en el propio laboratorio [465], o bien como generosa donación de alguna empresa. En la bibliografía se han descrito muchos patrones internos, que se pueden encontrar detallados en el apéndice II.

Si la extracción se lleva a cabo con hexano (o con heptano) y se van a analizar los analitos mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, cromatografía líquida de alta eficacia) en fase inversa, el disolvente de la extracción debe evaporarse y ser reemplazado por otro disolvente orgánico en el que los analitos sean solubles y que sea compatible con el sistema cromatográfico; es decir, más similar a la fase móvil (o la misma fase móvil) [455, 459, 466].

## 1.4.2 HPLC

Aunque se han desarrollado métodos de análisis de vitamina E mediante cromatografía de gases [460], cromatografía de fluidos supercríticos [464, 467], e incluso cromatografía electrocinética micelar [468], la separación mediante HPLC es, en general, más sencilla, rápida, sensible, selectiva y robusta. Las separaciones de vitamina E y productos relacionados mediante HPLC se realizan tanto en fase normal como en fase inversa.

### 1.4.2.1 HPLC en fase normal

En los sistemas que trabajan en fase normal, los analitos eluyen en orden de polaridad creciente, lo que, en el caso de la vitamina E, significa que el orden viene determinado por los metilos

en el anillo cromanol (v. Fig. 1). Las columnas de fase normal permiten la separación de todos los isómeros, mientras que el  $\beta$ - y el  $\gamma$ -tocoferol no se separan en las columnas convencionales de fase inversa. Además de esta mayor capacidad de separación, las separaciones en fase normal presentan la ventaja de que se pueda operar con disolventes fuertemente hidrofóbicos, lo cual ofrece una alta solubilidad para los lípidos y además toleran altas concentraciones de lípidos, que son fáciles de eliminar mediante disolventes apolares.

Se han empleado columnas de sílice con fases móviles binarias, isocráticas o en gradiente de hexano y 2-propanol [461, 469-477].

Sin embargo, las columnas en fase normal siguen mostrando pobre reproducibilidad, tiempos prolongados de equilibrado, baja estabilidad, y, además, emplean disolventes orgánicos peligrosos. En general, para el análisis de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y otros tejidos, la fase normal ha caído en desuso, porque en la mayor parte de los casos, los datos acerca de otros tocoferoles no son relevantes y la sencillez de la fase inversa representa una ventaja. No obstante, la fase normal se sigue empleando para el análisis de  $\alpha$ -tocoferol en tejidos, con resultados satisfactorios [461, 478, 479]

#### 1.4.2.2 HPLC en fase inversa

Los sistemas de HPLC en fase inversa separan los compuestos afines a la vitamina E en función de la saturación de la cadena lateral del fitilo y también en función del número de metilos sustituyentes del cromanol, pero no de su posición, por lo que los sistemas convencionales en fase inversa no consiguen separar el  $\beta$ - y el  $\gamma$ -tocoferol.

La fase móvil más empleada es el metanol, con pequeñas cantidades de agua, en condiciones isocráticas y resulta suficiente para la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol [142, 431, 439, 445, 450, 466, 480-495]. Si se desea cuantificar otros analitos, se tienen que desarrollar fases móviles más complejas, o gradientes [434, 444, 447, 496-498]. Hay que tener también en cuenta que para trabajar con detectores electroquímicos se tienen que añadir electrolitos a la fase móvil, normalmente sales de perclorato [432, 435, 442, 455, 463, 494, 495, 499-501].

#### 1.4.2.3 Detectores

Para la determinación de vitamina E y la mayor parte de los productos relacionados se pueden emplear los tres sistemas más habituales de detección en HPLC: detección electroquímica (ED), detección de fluorescencia (FD) y detección de absorbancia UV (UVD).

La ED es la más sensible y específica, debido a los potenciales de oxidación relativamente bajos de estos compuestos. Además, se pueden medir también los productos de oxidación, puesto que su reducción también es fácilmente accesible. Las quinonas no presentan fluorescencia,

por lo que los productos de oxidación no pueden detectarse con este sistema y el detector UV no tiene suficiente sensibilidad en la mayor parte de los casos. La ED es empleada en HPLC en fase inversa, puesto que los electrolitos necesarios son miscibles con fases móviles acuosas. Las dos modalidades de detección electroquímica, amperométrica [432, 447, 494] y coulombimétrica [443, 455, 494, 495, 500, 501], se han empleado para el análisis de tocoferoles y sustancias relacionadas.

La FD es también muy específica, y, aunque en general es unas diez veces menos sensible que la ED, la sensibilidad depende mucho de la composición de la fase móvil, que afecta enormemente a la emisión fluorescente y a la conductividad electroquímica. En cualquier caso, la FD es la elección principal para muchos investigadores, dado que es más fácil operar con estos detectores que con los electroquímicos y además son compatibles con fases móviles de cromatografía en fase normal.

La detección más empleada, sin embargo, es la UVD, a pesar de que la sensibilidad puede ser hasta mil veces menor que con los otros sistemas. Pero la sensibilidad es en muchos casos suficiente y el detector UV para HPLC es el más extendido. Además, los detectores UV equipados con *diode array* (hilera de diodos) permiten obtener un espectro UV de las sustancias que llegan al detector, lo que permite la identificación de los compuestos y la evaluación de la pureza del pico cromatográfico.

### **1.4.3 Valoración de vitamina E en tejido adiposo y glándula mamaria**

En estudios epidemiológicos se ha puesto de manifiesto que los niveles en sangre de  $\alpha$ -tocoferol son muy variables y están fuertemente influenciados por factores genéticos, “estilo de vida” y la ingesta de otros nutrientes [502]. Se ha estimado que en humanos el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo representa alrededor del 90% del contenido total de  $\alpha$ -tocoferol del organismo [234], aunque la estimación realizada en machos de rata de raza Wistar da como resultado que el 90% del  $\alpha$ -tocoferol total se encuentra repartido entre el hígado, músculo y tejido adiposo y en el adiposo estaría alrededor del 20-25% [174, 193]. El estudio del contenido en  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo ha demostrado ser preferible al del nivel de  $\alpha$ -tocoferol en plasma o hígado a la hora de estudiar retrospectivamente la ingesta de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta, pues hay variaciones muy grandes intraindividuales día a día en los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol, cosa que no ocurre en el adiposo [503]. Además, cambios cualitativos en la dieta no se manifiestan en el tejido adiposo hasta pasados varios meses [504].

Hay situaciones en las que específicamente se ha aconsejado cuantificar la vitamina E en tejido adiposo en vez de en plasma. Este es el caso de los pacientes de Abetalipoproteinemia,



enfermedad que se caracteriza porque los enfermos no pueden sintetizar la apolipoproteína B-100, imprescindible para la síntesis de LDL (principal vehículo transportador de vitamina E en humanos) [229]. Estos pacientes manifiestan los síntomas de carencia de vitamina E y sus niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y eritrocitos son entonces anormalmente bajos. Así pues, la determinación de vitamina E en tejido adiposo es un mejor reflejo de su disponibilidad [505, 506].

El análisis de vitamina E en tejido adiposo puede además proporcionar información valiosa a la hora de predecir el riesgo de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, pues es un reflejo de la situación nutricional de vitamina E. En estudios epidemiológicos tiene incluso la ventaja de que las biopsias de tejido adiposo se realizan muy fácilmente mediante aspiración por una aguja fina, resultan poco dolorosas para el paciente y no es necesario aplicar puntos de sutura [506].

La glándula mamaria es un tejido heterogéneo con una parte de tejido adiposo y una parte de tejido conectivo, que lo convierten en una matriz analítica compleja. Sin embargo, el estudio del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en este tejido es muy interesante en determinadas condiciones, como el final de la gestación y la lactancia, en las que se convierte en la principal fuente de vitamina E para los recién nacidos lactantes. No se ha encontrado en la bibliografía un método que determine el contenido en vitamina E en este tejido, ni en humanos ni en animales experimentales.

Los métodos que se desarrollen para medir vitamina E en estos tejidos deberán tener en cuenta que, como los tocoferoles son liposolubles, es muy difícil extraerlos de un tejido con alto contenido lipídico, como el adiposo y la glándula mamaria, con un disolvente apolar sin interferencias del resto de la matriz. En general, se han empleado tres tipos distintos de métodos de extracción: saponificación de un primer extracto lipídico y posterior extracción de los lípidos no saponificables [507], saponificación directa del tejido y a continuación extracción líquido-líquido [478, 508, 509] o extracción directa de  $\alpha$ -tocoferol empleando SDS [509]. Estos métodos tienen algunos inconvenientes conocidos: la saponificación provoca una pérdida importante de tocoferoles [510], incluso cuando se trabaja en condiciones protectoras como en oscuridad y en atmósfera de nitrógeno, mientras que es difícil retirar el SDS de las columnas cromatográficas, lo que disminuye significativamente su duración.

El contenido en  $\alpha$ -tocoferol del tejido adiposo en un principio se analizaba mediante cromatografía de capa fina (TLC) [511], pero en la actualidad la separación mediante HPLC acoplada a la detección por fluorescencia es, en general, el método de elección, debido a su sensibilidad, especificidad [233, 234, 505, 506] y la relativa rapidez del análisis [508]. El análisis en fase normal permite separar los diferentes isómeros, como ya se ha indicado, pero las columnas se contaminan rápidamente con el resto de componentes de la muestra, pudiendo hacer que se

modifiquen las condiciones de elución, además de tener una vida media más corta. De hecho, autores que en un principio utilizaban la fase normal [512], usaron posteriormente la fase inversa [513]. La detección por espectroscopía ultravioleta es también suficientemente específica [514], pero se requieren cantidades de tejido 10 veces superiores a las que se usan en el método que se describe en la presente Tesis, además de pertenecer a humanos, tienen una concentración superior de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo que la rata [193].

#### 1.4.4 Valoración de vitamina E en aceites

La determinación de vitamina E en aceites tiene un triple significado: Por un lado, se puede considerar como un índice de la calidad del aceite, ya que, por ejemplo, el aceite de oliva virgen presenta unos contenidos en tocoferoles y tocotrienoles superiores a los de cualquier otro tipo de aceite vegetal refinado. Es bien sabido que durante el refinado de los aceites, más exactamente durante la desodorización, se producen pérdidas significativas en el contenido de tocoferoles y tocotrienoles [515-517]. Por otra parte, también debemos destacar su importancia en lo que al control de pureza se refiere. Dado que se trata de una fracción que puede estar integrada por diferentes isómeros y en distintas proporciones según el aceite considerado, su determinación adquiere un interés indudable de tipo analítico, complementando de esta forma las determinaciones, ya clásicas, de ácidos grasos o esteroides, empleadas para verificar la pureza de un aceite [518, 519]. Por último, es de vital importancia resaltar el papel que juegan estas sustancias desde un punto de vista nutricional: Como ya se ha indicado, se ha demostrado que las grasas que consumimos deben aportar no sólo los PUFA necesarios sino también la cantidad de vitamina E que permita asegurar un equilibrio entre ambos [244, 246, 247]. Es pues tan importante la cantidad consumida de ácidos grasos esenciales como la proporción que se mantiene con la ingesta de vitamina E y es precisamente el aceite de oliva virgen el que presenta una relación vitamina E/PUFA más elevada, superando ampliamente los valores encontrados para cualquier otro aceite vegetal destinado al consumo [515].

El método oficial de medida de tocoferoles en aceites del Registro General Sanitario de Alimentos de España es uno de los más laboriosos y complicados y se basa en la saponificación de la muestra y extracción de tocoferoles, para su posterior análisis mediante TLC [520].

Aunque en una revisión realizada en 1986, los 24 métodos citados empleaban la saponificación y análisis mediante TLC [515], en la actualidad se utilizan métodos basados en la HPLC, tanto en fase normal [461, 518] como en fase inversa [248, 518, 521]. La HPLC en fase inversa presenta la ventaja de los tiempos cortos de equilibrado de columna y análisis y la alta reproducibilidad de los tiempos de retención. Esta técnica está limitada cuando se desean separar los isómeros  $\beta$ - y  $\gamma$ -, tanto de tocoferoles como de tocotrienoles. La HPLC en fase normal, por el

contrario, permite una buena separación de todos los isómeros, pero el tiempo de análisis es más largo que el de la HPLC en fase inversa y los tiempos de retención son mucho más variables [522].

En general, aunque se sigue empleando la saponificación [488], en la actualidad tiende a evitarse, disolviendo directamente el aceite en un disolvente orgánico, como heptano o cloroformo:metanol, disolución que se inyecta directamente para su análisis [248, 461, 518]. Cuando se emplea la saponificación, incluso en condiciones protectoras, las recuperaciones son bajas, generalmente menores de 80% [318, 509, 522].

### 1.4.5 Valoración de vitamina E en dietas

Los métodos usados para analizar tocoferoles en alimentos son, en términos generales, similares a los empleados en tejidos. Los alimentos tienen que ser homogeneizados y los tocoferoles extraídos directamente [461, 523, 524], o bien saponificados y extraídos [438, 472, 525-529].

Las dietas semisintéticas empleadas en estudios bioquímicos y metabólicos a menudo contienen iones metálicos libres, como  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , que aceleran la oxidación de los tocoferoles cuando la dieta entra en contacto con el agua en el proceso de homogeneización, por lo que es necesario trabajar con precauciones extra, como la adición de antioxidantes y/o sustancias quelantes de cationes oxidantes.

La vitamina E en estas dietas está normalmente presente en forma de  $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol y el contenido de ambos debe ser cuidadosamente evaluado cuando se pretende estudiar posteriormente la concentración de vitamina E en el plasma y tejidos de los animales que las ingieran.

Los tocoferoles de los alimentos se separan por HPLC en columnas de fase normal [523-525, 528, 530-538] o de fase inversa [438, 472, 526, 529, 539] y son generalmente detectados mediante fluorescencia.

El  $\alpha$ -tocoferol se detecta mejor por fluorescencia, pero el acetato de  $\alpha$ -tocoferol no tiene fluorescencia, por lo que se pueden desarrollar dos estrategias si se desea un método que permita cuantificar ambos analitos simultáneamente: 1) puesto que la saponificación hidroliza el enlace éster, sometiendo a la muestra a este proceso se puede conseguir eliminar las interferencias de los otros lípidos de la muestra y cuantificar todas las formas de  $\alpha$ -tocoferol como  $\alpha$ -tocoferol libre. 2) Por otra parte, el acetato de  $\alpha$ -tocoferol se puede detectar mediante UVD y el tratamiento de la muestra se simplifica; sólo hay que desarrollar unas condiciones de cromatografía que permitan el análisis de ambas formas en un tiempo razonable.

La posibilidad de acoplar en serie dos detectores no destructivos de la muestra, como son el UVD y el FD, permite trabajar con muestras que pueden tener un rango de concentración muy variable de  $\alpha$ -tocoferol, dependiendo del tipo de aceite o grasa que se utilizara en su elaboración.

### 1.4.6 Valoración de vitamina E y productos relacionados en sangre

La electroquímica se ha mostrado como una herramienta eficaz para el análisis del comportamiento redox del  $\alpha$ -tocoferol [540] y la detección amperométrica simultánea de  $\alpha$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferol quinona en HPLC con un detector con electrodos duales ha sido propuesta por otros autores [541], pero la cuantificación de los principales productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol, la  $\alpha$ -tocoferol quinona y la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, está muy limitada por la disponibilidad de los patrones de concentración conocida, que en la actualidad no se encuentran disponibles en las principales casas suministradoras de reactivos para análisis.

La conversión de  $\alpha$ -tocoferol a  $\alpha$ -tocoferol quinona es una oxidación, relativamente fácil de realizar en el laboratorio mediante  $\text{FeCl}_3$  en un medio metanol:agua a 60 °C. Esto produce la total oxidación del  $\alpha$ -tocoferol, pero también da lugar a gran cantidad de subproductos. Además, el proceso, aunque sencillo, resulta tedioso, pues la oxidación es lenta y hay que extraer el producto con un disolvente muy apolar, como el hexano, que hay que evaporar después para poder tener una disolución que valga como patrón de valoración.

Esta síntesis es, a pesar de todos los inconvenientes planteados, completamente viable si el objetivo final es únicamente la disolución de  $\alpha$ -tocoferol quinona, pero cuando se intenta obtener la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona a partir de la  $\alpha$ -tocoferol quinona, mediante su reducción con ditionito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) [433], el perfil cromatográfico de la disolución obtenida indica que hay muchas reacciones colaterales que pueden estar ocurriendo, lo que lleva a un patrón sin garantía analítica.

La síntesis electroquímica de ambos compuestos es, *a priori*, mucho más limpia e implica mucha menos manipulación de la muestra: A partir de  $\alpha$ -tocoferol se puede obtener mediante oxidación coulombimétrica  $\alpha$ -tocoferol quinona y a partir de ésta, mediante reducción coulombimétrica,  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, pues la deshidratación y reciclación del anillo cromanol no ocurre de manera espontánea.

Una vez obtenidos los patrones de cuantificación, el tratamiento de la muestra debe ser lo menos laborioso posible para que se pueda tener una garantía analítica de que los productos de

oxidación que se cuantifican no se generan en el tratamiento de la muestra, sino que reflejan realmente lo que ocurre en el organismo.

Estos compuestos relacionados con la vitamina E han sido a veces extraídos con hexano [161, 542], pero durante el proceso global se pierde la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, a menos que se trabaje en ausencia de oxígeno, lo cual no es fácil de conseguir. El BHT añadido a las muestras protege al  $\alpha$ -tocoferol de la oxidación, pero no a la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona y antioxidantes más fuertes pueden reducir a la quinona.

## 1.5 Validación de métodos analíticos

### 1.5.1 Generalidades

Validar un proceso es, en general, demostrar que ese proceso cumple con los objetivos para los que había sido propuesto. Validar un método analítico es, por tanto, establecer la evidencia documental de que cuando ese método sea aplicado correctamente, se obtendrán resultados con una fiabilidad contrastada [543-545].

La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas de que los métodos son adecuados para los análisis propuestos. Esto permite trabajar con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados, lo cual minimiza el número de fallos y repeticiones.

Una gran parte de la bibliografía existente relativa a la validación de métodos analíticos se ha realizado en función de las necesidades de la industria farmacéutica y se aplica a la valoración de muestras sintéticas de composición exactamente conocida o a muestras biológicas que se obtienen tras la administración de un fármaco y no es exactamente trasladable al caso de muestras biológicas en las que, por ejemplo, no existe el blanco sin el analito a determinar [546]. Por otra parte, las mismas entidades reguladoras tienen en cuenta esto mismo y admiten que no todas las características de la validación son necesarias para todos los tipos de métodos [545], e incluso la ICH (*International Conference on Harmonisation*) reconoce en la introducción a su Directriz Q2B que debido a su compleja naturaleza, los procedimientos analíticos para productos biológicos y biotecnológicos pueden ser abordados de una forma distinta a la que se recoge en sus documentos [547]. En definitiva, es responsabilidad de quien desarrolla y valida un método escoger el procedimiento de validación y el protocolo más adecuado para el producto [548].

Las propiedades que generalmente se evalúan son: selectividad, linealidad, exactitud, precisión (repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad), recuperación, rango, límites de detección y cuantificación, robustez y *ruggedness* (en la actualidad todavía no se ha implantado un

término en castellano para este concepto, que podría entenderse como solidez o resistencia) [543-545, 547, 549]. Además, se debe conocer la estabilidad de los analitos de interés, tanto en las disoluciones de trabajo como en la muestra, aunque este estudio no pertenezca a la validación propiamente dicha. Como ya se ha indicado, no es necesario evaluar todos los parámetros para considerar un método válido. En los métodos cuya validación se describe en la presente Memoria se han considerado la linealidad (de analitos y de cantidad de muestra), la precisión (repetitividad y precisión intermedia) y la exactitud (expresada como porcentaje de recuperación). A continuación se describe brevemente cada uno de estos parámetros y la forma en que se pueden evaluar.

## 1.5.2 Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que sean proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible, se buscará una respuesta de tipo lineal, lo que facilitará su trazado, interpolación e interpretación, pero a veces no es posible, por lo que hay que recurrir a otros tratamientos matemáticos [543].

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad. Esto supone que no es necesario conocer todo el rango de concentraciones en las que el método cumple las especificaciones, sino que se demuestran estas propiedades en un rango alrededor de una concentración determinada, que viene dada por la experiencia de las pruebas previas a la validación.

Para evaluar la linealidad se recomienda estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlos por triplicado. Para métodos que se van a aplicar a muestras como los preparados farmacéuticos, en los que se esperan sólo pequeñas variaciones alrededor del contenido teórico (100%) el rango en el que se ensaya la linealidad es relativamente estrecho, normalmente alrededor de  $\pm 20\%$  [543]. En los métodos que se van a aplicar a muestras en las que se desconoce la posible variabilidad se debe demostrar la linealidad en un rango más amplio, como por ejemplo desde 25% hasta 200%.

Con los resultados del experimento de linealidad se estudia la relación entre las cantidades o concentraciones ( $x$ ), variable independiente o predictiva, con la respuesta ( $y$ ), variable dependiente, como por ejemplo áreas, alturas, o señales corregidas frente a las del patrón interno correspondiente. La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y = a + b \cdot x$ , obtenida por un método de ajuste, normalmente el de mínimos cuadrados. Si la relación no es lineal, se puede intentar alguna transformación matemática previa para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con las variables experimentales permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas (tiene sesgo), significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático (por exceso o por defecto) en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).

Pero el estudio de la linealidad implica además una comprobación estadística, un análisis de la regresión con todos sus parámetros [543]. Aunque en el informe de la validación de un método no es necesario adjuntar todos los valores y gráficos, sí resulta conveniente estudiarlos:

- Ecuación de la recta: En la recta de regresión  $y = a + b \cdot x$ ,  $x$  es la concentración y la respuesta,  $b$  el valor de la pendiente y  $a$  el término independiente. La pendiente  $b$  se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que cuanto mayor es la pendiente, mayor sensibilidad, es decir, que hay mejor respuesta del método a las variaciones en la concentración del analito. El término independiente  $a$ , u ordenada en el origen, es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de 0 cuando no existe sesgo.
- Coeficiente de correlación ( $r$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ): El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable  $x$  (concentración) y la variable  $y$  (respuesta). Su valor máximo es 1. Si  $r$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0.9990$ , aunque dependiendo del nivel de analito en la muestra se admite  $\geq 0.990$ . La información obtenida mediante el cálculo de  $r$  es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo el coeficiente de determinación  $r^2$  el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de  $y$  explicada por el modelo. A pesar de esto, es habitual que, aunque se calculen ambos parámetros, a la hora de presentar los resultados se indique sólo el valor de  $r$ .
- Homoscedasticidad. La representación de los residuales aporta mucha información acerca de la validez del modelo. La forma más habitual de representación consiste en representar los residuales (ordenadas) frente a los valores estimados (abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.
- Tests de linealidad: El factor de respuesta expresa la relación entre la lectura o respuesta y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibili-

dad del calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Mediante el coeficiente de variación del factor de respuesta se pueden extraer conclusiones acerca de la linealidad de la recta, pues valores superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%, siempre teniendo en cuenta el nivel de analito en la muestra. También se puede analizar la linealidad mediante la desviación estándar de la pendiente, contrastando la hipótesis de que la pendiente es significativamente distinta de 0 mediante una prueba basada en la *t* de Student con el área de rechazo definida por  $b/S_b > t_{n-2;\alpha}$ , o bien calcular los intervalos de confianza para la pendiente, que no deben incluir el 0.

- Test de proporcionalidad: Es necesario también conocer si la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando si la variable independiente es significativamente distinta de 0. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito en el valor asignado como 100%. Para llevar a cabo este test se recurre, como en el caso anterior, a una prueba de significación según la *t* de Student, mediante la que se contrasta la hipótesis de que la ordenada en el origen tiene que ser igual a 0 para el nivel de significación escogido, con el área de rechazo definida por  $a/S_a > t_{n-2;\alpha}$ ; esto implica también que en los intervalos de confianza alrededor de la ordenada en el origen debe estar incluido el 0. En caso de no cumplirse el test de proporcionalidad, a la hora de valorar una muestra sería necesario interpolar el resultado del análisis entre al menos dos patrones, uno superior y otro inferior, para obviar así el sesgo del método.

En el estudio de linealidad no se suele incluir un parámetro que se podría definir como “linealidad de muestra”, que supone estudiar la señal con distintas cantidades de muestra alrededor de la que se quiere validar. En los métodos que implican extracción es un parámetro útil, pues permite definir un rango de muestras con el que se puede llegar a trabajar, sin variar el resto de parámetros, si en algún caso no hay muestra suficiente, o bien si conviene tomar más muestra porque la concentración de analito en la muestra sea anormalmente baja. Es útil también conocer el comportamiento del método con distintas cantidades de muestra cuando se va a aplicar el método de rutina a muestras de las que no se sabe de cuánto se va a disponer, como los tejidos biológicos. La estadística a aplicar es la misma que en el caso de la linealidad de analito.



### 1.5.3 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como verdadero (valor de referencia) y el valor experimental encontrado [543, 545].

La principal complicación del cálculo de la exactitud está en la determinación de cuál es el valor verdadero en la muestra. Si se dispone de muestras con contenido certificado, es sencillo, pues basta con aplicar el método a validar sobre la muestra con un contenido conocido de analito. También se acepta la comparación con un método de referencia validado y la relación entre los valores obtenidos al aplicar a la muestra ambos métodos expresa también la exactitud. La forma más habitual de estimar la exactitud es la que se conoce como placebo cargado, que se basa en una muestra blanco, es decir, que contiene todos los elementos de la matriz de la muestra pero no el analito en cuestión, que se añade de forma controlada para posteriormente analizar con el método a validar la muestra así creada y la relación entre la cantidad encontrada y la teórica expresará la exactitud [543].

Estas tres aproximaciones son las habituales cuando se trabaja con muestras como los preparados farmacéuticos, pero cuando se quiere validar un método para muestras de las que no se dispone de material de referencia, no se conoce ningún método de referencia y no existe una matriz sin analito (el caso más habitual cuando se quiere medir alguna sustancia no farmacológica en muestras biológicas), se debe realizar alguna otra aproximación y se puede aplicar la técnica de la adición de patrón, mediante la cual se prepara una serie de muestras que contengan todas la misma cantidad de la misma muestra y se les añaden cantidades conocidas crecientes del analito de interés, conservando un nivel sin añadir nada. Se evalúa entonces la linealidad obtenida, y, para cada uno de los puntos, se puede conocer la relación entre la cantidad encontrada y la teórica, lo que nos indicará la exactitud del método. La media de todas las relaciones debe ser, de forma ideal, igual a 1 (100%) y esta hipótesis se debe contrastar [543, 546]. Debería ser equivalente a contrastar la hipótesis de que la pendiente de la recta obtenida al representar las cantidades encontradas frente a las teóricas sea igual a 1, aunque no siempre se cumplan ambas condiciones simultáneamente.

Esta relación entre la cantidad encontrada y la teórica se conoce generalmente como recuperación, aunque existen también otras definiciones de la recuperación [543], basadas en la eficacia en la extracción del analito a partir de la matriz biológica. La recuperación cuantificada mediante la adición de patrón engloba a ambos conceptos.

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra y de la concentración de analito en la muestra. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en según qué tipos de muestras de matrices complejas sólo se obtienen valores inferiores al 80%.

**Cuadro 1:**  
Factores de recuperación aceptados según la AOAC

Porcentaje de analito en la muestra (p/p)	Factor de Recuperación (%)
100	98-102
≥10	98-102
≥1	97-103
≥0.1	95-105
0.01	90-107
0.001	80-110
0.0001	80-110
0.00001	80-110
0.000001	60-115
0.0000001	40-120

En el Cuadro 1 se presenta el criterio de aceptación de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), que puede orientar en la estimación de la recuperación que se debería obtener en función de la concentración de analito en la muestra, aunque pueden aceptarse valores de recuperación más bajos según las necesidades del método [543].

## 1.5.4 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (o de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones fijadas [543].

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados no pueden ser siempre controlados y de aquí la importancia del estudio de precisión.

La precisión engloba distintos tipos de estudios:

- La repetitividad (o repetibilidad, o precisión intra-ensayo) estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis realizados de forma independiente sobre la misma muestra homogénea en las mismas condiciones operativas (mismo analista, equipo, reactivos, etc), en un mismo laboratorio y en un periodo corto de tiempo. Se expresa matemáticamente por el valor de RSD (*Relative Standard Deviation*) de una serie de medidas, 5 ó 6 [543, 546, 548]. Uno de los factores que más pueden influir en este parámetro es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración, por lo que si se trabaja con concentraciones altas se aceptan valores de RSD más bajos que cuando se trabaja con concentraciones más bajas. En función de la concentración del analito, la AOAC propone una serie de valores límite de RSD, que se resumen en el cuadro 2. Pero no es el único cri-

terio, otros autores, como Kolthoff y Horwitz han propuesto otros valores, que también se resumen en el Cuadro 2 [543].

Porcentaje de analito en la muestra	RSD (%) máximo Kolthoff	RSD (%) máximo Horwitz	RSD (%) máximo AOAC
100	0.1-0.3	2	1.3
50	0.3	2.2	
10	1	2.8	1.8
1	2.0-5.0	4	2.7
0.1	5.0-10.0	5.7	3.7
0.01	10	8	5.3
0.001		11.3	7.3
0.0001		16	11
0.00001			21
0.000001			30

**Cuadro 2:** Valores máximos de RSD para aceptar la repetitividad del método.

- Dentro de la repetitividad se puede estudiar separadamente la instrumental, es decir, la variación debida a las posibles imprecisiones debidas al sistema de inyección, detección, etc. Se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces y estudiando el porcentaje de variación de la señal obtenida. La precisión instrumental obtenida debería ser inferior al 1%. La variabilidad instrumental se puede considerar incluida dentro de la del método, y, en cualquier caso, resulta conveniente en la aplicación del método a los ensayos de rutina comprobar antes de cada análisis la adecuabilidad del sistema mediante el análisis repetido de un mismo patrón.
- La precisión intermedia estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en el mismo laboratorio, pero en condiciones operativas distintas. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos por separado, sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. Generalmente se aceptan valores de coeficientes de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetitividad del método.





# Objetivos



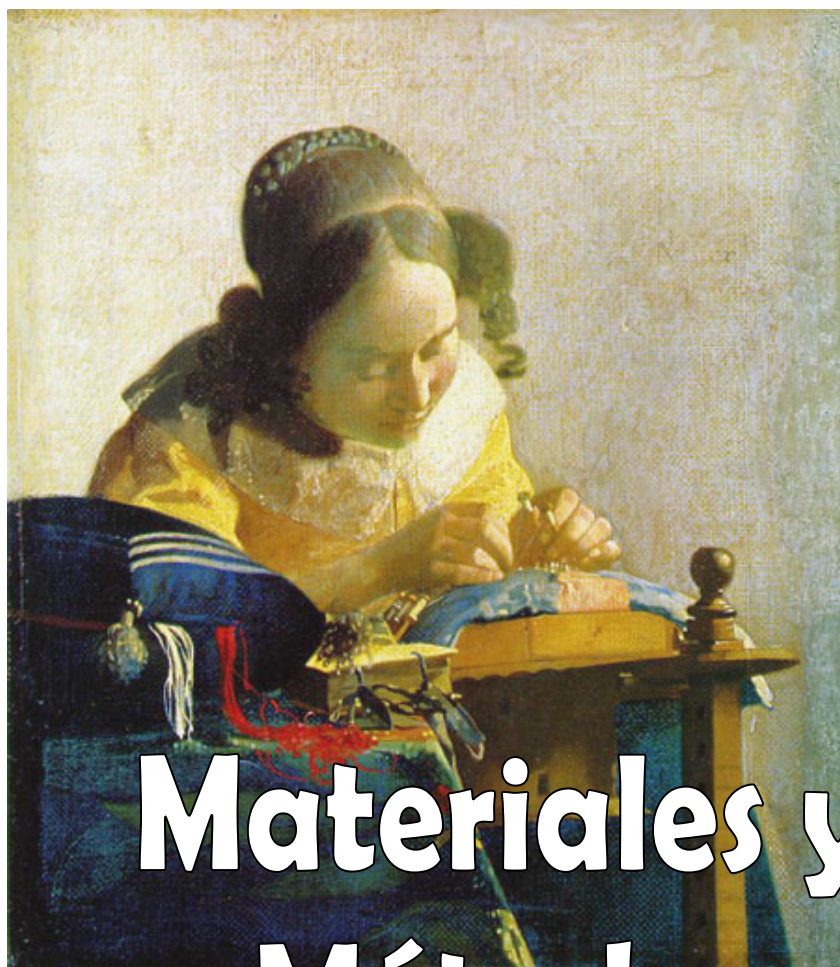
## 2 OBJETIVOS

Dados los diversos problemas o contradicciones que hemos ido analizando sobre el papel de la vitamina E en situaciones de cambios en el estrés oxidativo y en particular la dieta rica en determinados ácidos grasos, la gestación y la diabetes, en la presente Tesis nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- Poner a punto, desarrollar y validar nuevos métodos de análisis de  $\alpha$ -tocoferol en todas las matrices que han interesado para el estudio: aceites y grasas, dietas experimentales, tejido adiposo, glándula mamaria y sangre total
- Estudiar la influencia de cambios en la composición de ácidos grasos de la dieta sobre los niveles endógenos de  $\alpha$ -tocoferol en ratas vírgenes y en gestantes. En este segundo caso, conociendo que la gestación *per se* produce un incremento en el estrés oxidativo, cabría esperar que en esta situación la respuesta a los cambios de ácidos grasos de la dieta diferiría de la que encontraríamos en las ratas vírgenes.
- Determinar las consecuencias en el desarrollo perinatal de la rata sometida a condiciones dietéticas que conlleven la aparición de una deficiencia generalizada en vitamina E y la potencial respuesta a la suplementación.
- Estudiar parámetros del metabolismo del  $\alpha$ -tocoferol en ratas alimentadas con distintos tipos de ácidos grasos y sometidos a diabetes experimental, a fin de llegar a conocer en una situación diferente a la gestación, de qué forma influye la ingesta de una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados en condiciones en que hay una tendencia al estrés oxidativo, como es el caso de la diabetes.







# Materialles y Métodos



## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Animales experimentales

#### 3.1.1 Condiciones generales de estabulación

Para todos los experimentos recogidos en la presente Memoria se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley (Ico:OFA-SD, Charles River Laboratories, España) criadas en el propio animalario de la Universidad San Pablo-CEU. En todos los experimentos las condiciones de estabulación fueron las mismas (v. Fig. 8): temperatura de  $22 \pm 2$  °C y humedad relativa  $55\% \pm 10\%$  con la frecuencia adecuada de renovaciones de aire, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (la luz se enciende a las 08:00h). La dieta que toman las ratas hasta entrar en el estudio correspondiente es la “Dieta de mantenimiento para rata y ratón” (RMM, Harlan Interfauna Ibérica, Madrid, España).



**Fig. 8:** El animalario de la USP-CEU. Celda de cría

#### 3.1.2 Métodos de tratamiento de los animales

##### 3.1.2.1 Gestación y Lactancia

Para los experimentos en los que se deseó estudiar la gestación, se seleccionaron ratas hembras con un peso similar y se aparearon en harén (en la proporción de unas 6 hembras por macho) con un macho de la misma cepa. Cuando aparecieron espermatozoides en el frotis vaginal se consideró día 0 de la gestación y se colocaron en una jaula aparte. La mitad de los animales se mantuvieron vírgenes y se estudiaron en paralelo a las ratas preñadas. Una vez preñadas, las ratas se asignaron a un determinado grupo experimental y se mantuvieron en jaulas comunitarias durante toda la gestación. Estas jaulas eran del tipo IV ( $1820 \text{ cm}^2$ ), tenían

un lecho de viruta de chopo (29/12 ó 7/4, Souralit, España) y nunca se mantuvo a más de 6 ratas por jaula.

Si sólo se deseaba estudiar la gestación, los animales no llegaron a parir, mientras que cuando se deseó estudiar la lactancia, en el día 20 (uno antes del parto) se trasladaron a jaulas individuales tipo III (800 cm<sup>2</sup>) con nueva viruta (C32/23, Souralit, España), donde se mantuvieron durante toda la lactancia con la camada.

### 3.1.2.2 *Desarrollo postnatal*

Para estudiar la evolución postnatal de las crías se evaluaron distintos parámetros indicadores de un correcto desarrollo, basándonos en los descritos por López-Tejero *et al* [550]. El desarrollo se estudió según la ganancia de peso corporal, el aumento de talla corporal, la aparición de los incisivos superiores e inferiores, la apertura del conducto auditivo externo, la separación de párpados, el test de adquisición del reflejo de giro en el aire (ARR, *Air Righting Reflex*) y el test de adquisición del reflejo de giro en superficie (SRR, *Surface Righting Reflex*).

La talla se midió siempre desde la punta del hocico de la rata hasta la base de la cola. La adquisición del ARR se evaluó dejando caer a las crías colocadas en posición dorsal desde unos 50 cm sobre una superficie blanda. El test se considera positivo cuando la rata consigue girarse en el aire y caer en posición normal. El test de adquisición del SRR se lleva a cabo depositando a las crías boca arriba sobre una superficie blanda y cronometrando el tiempo (hasta 60 segundos) que tardan en girarse.

Para evaluar todos estos parámetros sin un excesivo estrés tanto para las madres como para las crías, se mantuvo separada a la camada de la madre durante la realización de los tests y además en superficie caliente (aproximadamente 37 °C) para imitar las condiciones del nicho materno.

### 3.1.2.3 *Estimación de la producción de leche*

La producción de leche de las madres se estimó siguiendo el método descrito por Sampson y Jansen [551]. Este método calcula la producción de leche de manera sencilla a partir de la ganancia de peso de las crías en 24 horas, teniendo en cuenta la energía necesaria para el mantenimiento de estructuras de las crías. La ecuación que relaciona estos parámetros es

$$\text{Producción} = 0.0322 + 0.0667 \times \text{Peso inicial} + 0.877 \times \text{Ganancia}$$

donde

*Producción* = Cantidad de leche producida por una madre (g/cría/día)

*Peso inicial* = Peso medio de las crías antes de las veinticuatro horas (g)

*Ganancia* = Diferencia en el peso medio de las crías tras veinticuatro horas (g/día)

### 3.1.2.4 *Obtención de leche*

Para obtener una muestra de leche de las madres se siguió un protocolo previamente descrito [552]: se anestesió a las madres mediante una inyección i.p. (intraperitoneal) de una mezcla de ketamina (Imalgène 500, Rhône Mérieux, Francia) y clorpromacina (Largactil, Rhône-Poulenc, España) (9 mg y 0.25 mg, respectivamente, en 0.5 mL, correspondientes a 200 g de animal). Una vez dormidas, a las ratas se les inyectó i.p. 0.25 mL/200 g de animal de una disolución de oxitocina (2 IU/mL Syntocinón, Novartis Farmacéutica, España) e inmediatamente después se inició un suave masaje en los doce pezones, recogiendo la leche en tubos enfriados en hielo.

### 3.1.2.5 *Diabetes*

En la presente tesis se utilizó la diabetes como situación en la que se incrementa el estrés oxidativo. Una de las formas de inducir esta situación patológica, es mediante la administración de estreptozotocina (STZ), droga que ataca selectivamente a las células  $\beta$  productoras de insulina de los islotes de Langerhans del páncreas.

Para inducir una diabetes severa se administró i.p. 5 mg de STZ (Sigma, España) por cada 100 g de animal, disuelta (200 mg/mL) en una disolución de ácido cítrico (Panreac, España) 0.05 M pH 4.5. Se consideró establecida la patología si a los tres días de la administración la concentración de glucosa en sangre era superior a 150 mg/dL.

### 3.1.2.6 *Obtención de tejidos y sacrificio*

Para la obtención de pequeñas muestras de sangre se ha realizado de dos formas: una pequeña punción en la vena safena permite la obtención de una gota de sangre para la determinación de la glucosa, de forma poco traumática para el animal. Para la obtención de 1-2 mL de sangre se consideró preferible obtenerla del extremo del rabo. Para este método, se realizó un pequeño corte en el extremo del rabo y se obtuvo la sangre aplicando un suave masaje a lo largo del apéndice.

En los experimentos descritos en esta Memoria se han empleado dos métodos de sacrificio: cuando no se deseaba analizar la sangre total (porque sólo se analizaba el plasma), los animales se sacrificaron por decapitación y la sangre del cuello se recogió en tubos con EDTA- $\text{Na}_2$  (aproximadamente 1 mg/mL sangre). Sin embargo, cuando interesaba analizar el contenido en  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocoferol quinona y  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona en sangre total con suficiente garantía analítica, se consideró necesario obtener la sangre de una forma en la que la muestra fuera más homogénea: mediante punción cardíaca bajo anestesia i.p. de ketamina/acepromacina (7.5-10 mg/100 g de animal y 0.25 mg/100 g de animal, respectivamente). La sangre se recogió en tubos con EDTA- $\text{Na}_2$  (aproximadamente 1 mg/mL de sangre).

Una vez obtenida la sangre de cualquiera de las dos formas, el plasma se separó por centrifugación a 500 g durante al menos 20 min, a 4°C. Se tomaron alícuotas (0.75-1mL), que se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

Tras el sacrificio del animal, se extrajeron los distintos tejidos en función del experimento, que se congelaban inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, se pesaban y fueron posteriormente almacenados a -80 °C hasta el momento de su análisis.

### 3.2 Dietas experimentales

En todos los experimentos se han utilizado dietas semisintéticas basadas en la utilizada previamente en nuestro laboratorio [553], con la composición básica que se resume en el Cuadro 3. Esta composición variaba ligeramente en cada experimento, en función del tipo y contenido de grasa, cantidad de almidón y de vitamina E y estas diferencias también se indican en el Cuadro 3.

Ingrediente	P	G	O	PE	PE-gL	PE-AA	PE-10E	G-2E	O-2E	PE-2E
Caseína <sup>1</sup>	170	170	170	170	170	170	170	170	170	170
Sales minerales <sup>2</sup>	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitaminas <sup>3</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Colina (HCl)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Celulosa <sup>4</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Almidón de maíz <sup>5</sup>	630/580	630/580	630/580	630/580	580	580	580	580	580	580
Grasa	Palma 50/100									
	Girasol	50/100						100		
	Oliva		50/100						100	
	Pescado			50/100	80	80	100			100
	Borraja				20					
	ARASCO					20				
Acetato de $\alpha$ -tocoferol	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	1	0.2	0.2	0.2

**P:** Dieta con grasa de Palma (Cargil, España); **G:** Dieta con aceite de girasol (Koipe, España); **O:** Dieta con aceite de oliva (virgen extra 1º, Koipe, España); **PE:** Dieta con aceite de pescado (Cofares, España); **PE-gL:** Dieta con aceite de pescado enriquecida con ácido  $\gamma$ -linolénico por el aceite de borraja (Larodan Fine Chemicals, Suecia); **PE-AA:** Dieta con aceite de pescado enriquecida con ácido araquidónico por el ARASCO (Martek Biosciences Corp., EE.UU.); **PE-10E:** Dieta con aceite de pescado suplementada con 1 g de vitamina E/kg de dieta seca; **G-2E:** Dieta con aceite de girasol con 200 mg de vitamina E/kg de dieta seca; **O-2E:** Dieta con aceite de oliva con 200 mg de vitamina E/kg de dieta seca; **PE-2E:** dieta con aceite de pescado con 200 mg de vitamina E/kg de dieta seca.

<sup>1</sup> **Caseína:** Caseína ácida industrial, humedad <12%, grasa <2%, acidez <11 ccs, (Manuel Riesgo, Madrid, España)

<sup>2</sup> **Sales minerales:** CuSO<sub>4</sub> 0.1; NH<sub>4</sub>MoO<sub>4</sub> 0.026; NaIO<sub>4</sub> 0.0003; K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> 0.028; ZnSO<sub>4</sub> 0.091; CaHPO<sub>4</sub> 0.145; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.338; MgSO<sub>4</sub> 3.37; MnSO<sub>4</sub> 1.125; NaCl 4; CaCO<sub>3</sub> 9.89; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.75

<sup>3</sup> **Vitaminas:** Biotina 5·10<sup>-4</sup>; ácido fólico 5·10<sup>-3</sup>; menadiona (bisulfito sódico) 8.3·10<sup>-4</sup>; retinil palmitato 2.4·10<sup>-3</sup>; colecalciferol 2.5·10<sup>-5</sup>; tiamina 6.6·10<sup>-3</sup>; ácido ascórbico 0.1

<sup>4</sup> **Celulosa:** Celulosa tipo Avicel, humedad < 3.7%, pH=6.2, pureza > 99.3% (Manuel Riesgo, Madrid, España)

<sup>5</sup> **Almidón de maíz:** Cerestar, humedad < 12% (Manuel Riesgo, Madrid, España)

**Cuadro 3:** Composición de las dietas empleadas en los experimentos descritos en esta Memoria. Todas las cantidades están expresadas en g/kg de dieta seca.

El perfil de ácidos grasos de todos los aceites fue determinado mediante cromatografía de gases y se detalla en el Cuadro 4.

Las dietas se prepararon siempre de la misma forma: se mezclaron los componentes mayoritarios (caseína, almidón y celulosa) en la proporción adecuada para preparar de 4 a 6 kg de dieta seca con el aceite correspondiente, en el cual se habían disuelto las vitaminas liposolubles. En paralelo se preparaba una suspensión acuosa de todos los minerales, vitaminas hidrosolubles y la colina. Una vez homogeneizados los componentes sólidos con el aceite, se añadía la suspensión, amasando continuamente y se añadía agua de forma semicuantitativa hasta aproximadamente unos 4-6 litros, de manera que la humedad de la dieta era aproximadamente del 50%. Una vez mezclado y homogeneizado todo, se prepararon pequeñas fracciones (unos 150 g), que se envolvían en papel de aluminio para protegerlas de la luz y se protegían de la oxidación guardándolos en bolsas de plástico con cierre hermético en atmósfera de nitrógeno. Se almacenaban a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se descongelaban a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de doce horas antes de su administración a las ratas.

Ácido Graso (%)	Grasa de palma	Aceite de Girasol	Aceite de Oliva	Aceite de Pescado	Aceite de Borraja	ARASCO
12:0	40.7	0.3	0.31	<0.1	<0.1	<0.1
14:0	15.1	0.3	0.33	4.1	<0.1	0.5
16:0	16.8	7.1	10.9	20.7	9.9	8.8
18:0	22.4	4.9	3.6	3.5	4.4	9.8
16:1 $\omega$ 7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
18:1 $\omega$ 9	5.0	23.6	<b>74.8</b>	23.3	16.2	17.1
18:2 $\omega$ 6	<0.1	<b>62.13</b>	7.4	<0.1	28.2	6.7
18:3 $\omega$ 6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<b>41.2</b>	3.0
20:4 $\omega$ 6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<b>43.9</b>
20:5 $\omega$ 3	<0.1	<0.1	<0.1	<b>9.5</b>	<0.1	0.2
22:6 $\omega$ 3	<0.1	<0.1	<0.1	<b>11.4</b>	<0.1	<0.1

**Cuadro 4:** Proporción de los distintos ácidos grasos presentes en los aceites empleados para la preparación de las dietas. En negrita, los ácidos grasos mayoritarios y/o característicos

Dentro de las dietas que contienen un mismo porcentaje de grasa, las dietas son equicalóricas. Las dietas con un 5% de grasa aportan 3650 kcal/kg de dieta, de las cuales la grasa representa un 12.3% de la energía total, mientras que las que contenían un 10% de grasa aportan 3900 kcal/kg de dieta, de las cuales la grasa representa un 23% de la energía total.

### 3.3 Diseños experimentales

#### 3.3.1 Experimento 1: Ingesta durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa

Para estudiar el efecto de dietas que se diferenciaban en el tipo y cantidad relativa de grasa de la dieta durante la gestación, se emplearon 86 ratas, repartidas en 16 grupos experimentales, 8 de ratas preñadas y 8 de vírgenes, como se esquematiza en la Fig. 9. Las ratas se alimentaron con la dieta correspondiente (descritas en el cuadro 3) durante toda la gestación o un tiempo equivalente en el caso de las no gestantes. La identificación de los grupos es la siguiente<sup>1</sup>:

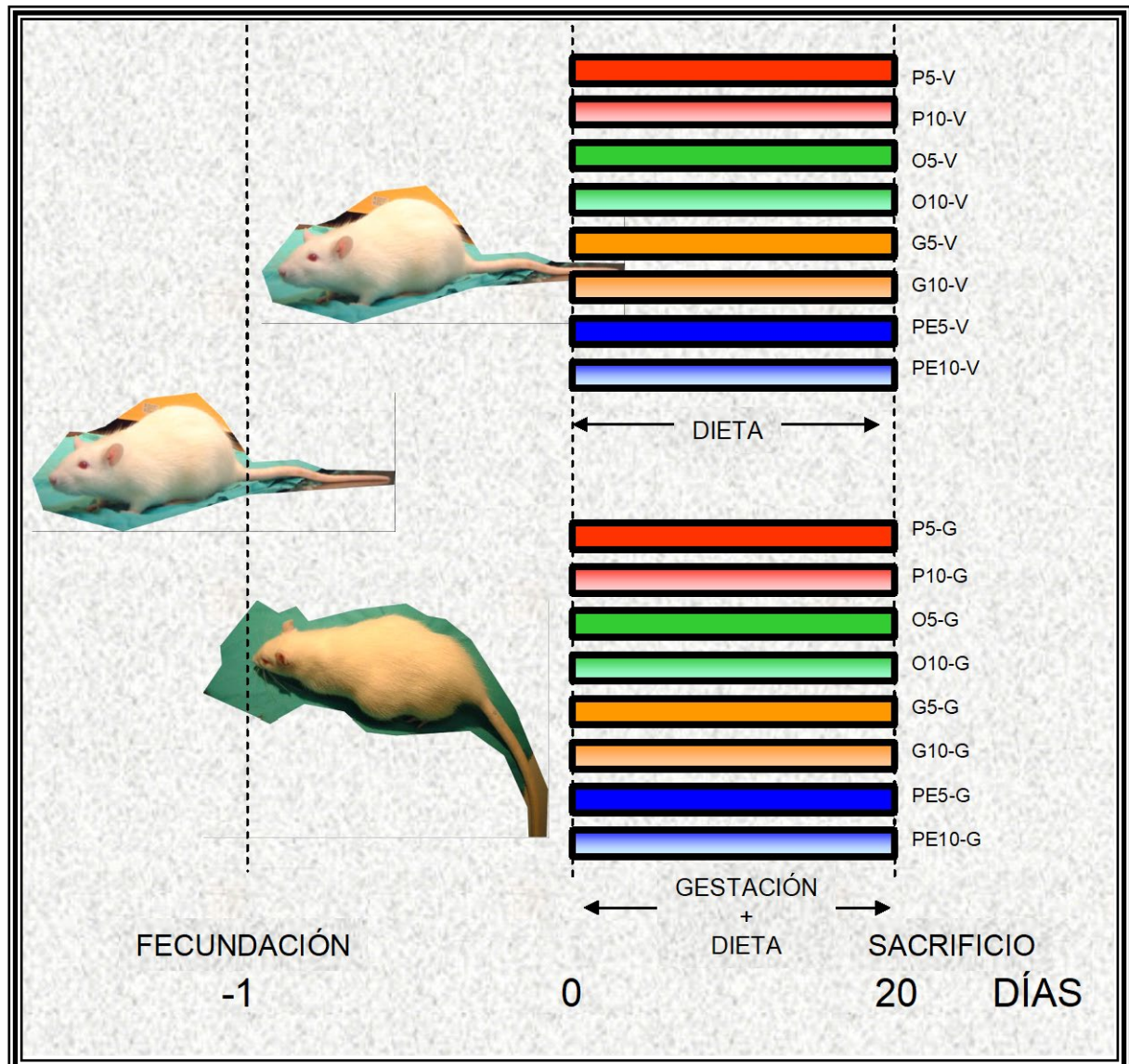
- **P5-V y P10-V**: Ratas vírgenes alimentadas con la dieta **P** (palma) al 5% (P5-V) o al 10% (P10-V), (n=6 y n=5).
- **G5-V y G10-V**: Ratas vírgenes alimentadas con la dieta **G** (girasol) (n=5 y n=4).
- **O5-V y O10-V**: Ratas vírgenes alimentadas con la dieta **O** (oliva) (n=6 y n=5).
- **PE5-V y PE10-V**: Ratas vírgenes alimentadas con la dieta **PE** (pescado) (n=5 y n=6).
- **P5-G y P10-G**: Ratas gestantes alimentadas con la dieta **P** (n=6 y n=5).
- **G5-G y G10-G**: Ratas gestantes alimentadas con la dieta **G** (n=5 y n=4).
- **O5-G y O10-G**: Ratas gestantes alimentadas con la dieta **O** (n=6 y n=5).
- **PE5-G y PE10-G**: Ratas gestantes alimentadas con la dieta **PE** (n=5 y n=6).

Se seleccionaron ratas hembras de un peso entre 180 y 200 g (aproximadamente de noventa días de edad). Cuarenta y dos de estas ratas se cruzaron con machos de la misma cepa y el resto permanecieron sin preñar. El día 0 de gestación y/o tratamiento comenzaron a ser alimentadas con la correspondiente dieta, que se les suministraba cada mañana después de retirar y pesar la del día anterior, dato que se anotaba y era orientativo de la ingesta de los animales. En el día 20 de la gestación/tratamiento se sacrificó a los animales mediante decapitación.

Todos los animales se sacrificaron entre las 8:30 y las 10:30. Se recogió la sangre como se ha descrito en el apartado 3.1.2.6 y se diseccionó a los animales para extraerles y pesar el hígado y el tejido adiposo lumbar, y, en el caso de las madres preñadas, además el *conceptus*. De este *conceptus* se extrajeron y pesaron las placentas y cada uno de los fetos. Las placentas se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido y los fetos se decapitaron rápidamente, recogiendo la sangre de todos los fetos de una misma madre en un mismo tubo con EDTA-Na<sub>2</sub>. Se extrajo también el hígado de los fetos, que también se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó posteriormente a -80 °C.

<sup>1</sup> Para la identificación de los grupos, se ha seguido siempre el mismo criterio: primero unas letras para indicar el tipo de dieta (según el código del Cuadro 3), con un número en el primer experimento para indicar el porcentaje de grasa, (que en todos los demás experimentos fue siempre del 10%) y luego una letra para indicar la condición de los animales (V-vírgenes, G-gestantes, L-lactantes, D-Diabéticos)





**Fig. 9:** Diseño Experimental 1: Ingesta durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa

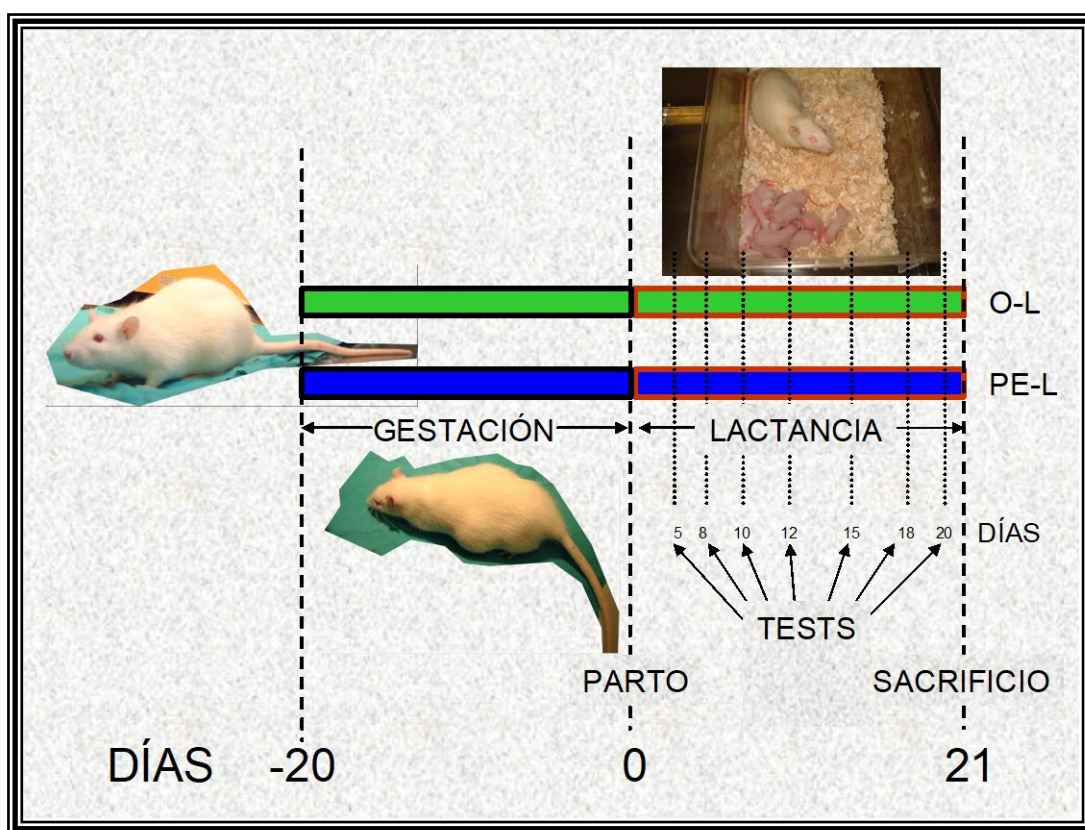
### 3.3.2 Experimento 2: Ingesta de dietas con aceite de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia

En este experimento se utilizaron 13 ratas preñadas que se dejaron parir y estaban distribuidas en dos grupos experimentales:

- **O-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y lactancia con dieta **O** (n=6).
- **PE-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y lactancia con dieta **PE** (n=7).

Las ratas partían de un peso inicial de 180-200 g. Se cruzaron con machos de la misma cepa y empezaron a tomar la correspondiente dieta en el día 0 de la gestación. Las ratas de cada grupo tomaron la dieta correspondiente durante toda la gestación y la lactancia.

Tras el nacimiento, todas las camadas se uniformizaron a 8 crías. El día en que nacieron, se pesó y midió a las crías que no iban a continuar el experimento y en los días señalados en el diseño experimental (Fig. 10) se estudió el desarrollo postnatal de las 8 crías restantes, como se detalla en el apartado 3.1.2.2.

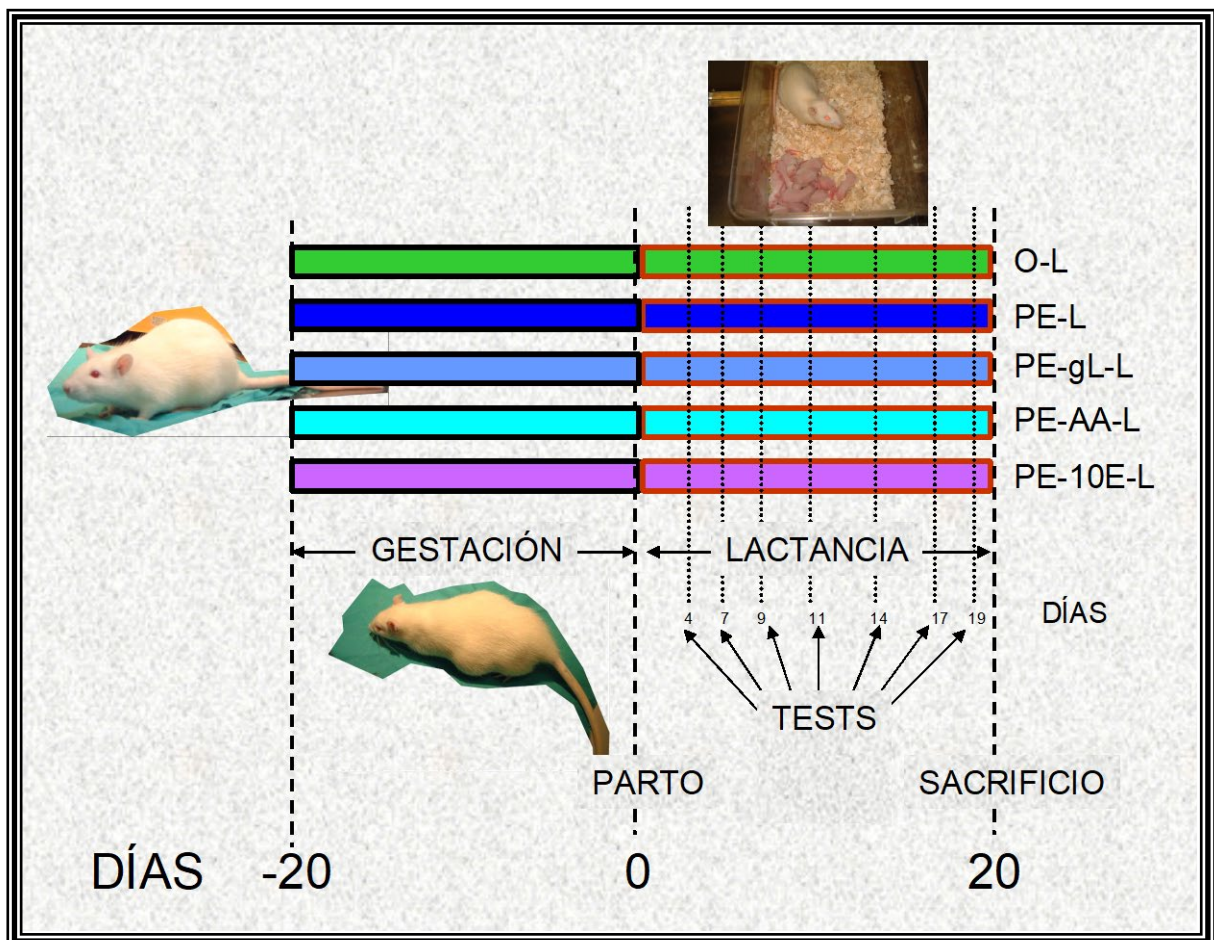


**Fig. 10:** Diseño Experimental 2: Ingesta de las dietas de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia

Las madres y sus crías se sacrificaron en el día 21 de la lactancia, mediante decapitación. Se recogió y mezcló la sangre de todas las crías procedentes de una misma madre y la sangre se procesó como siempre para obtener el plasma. Se extrajeron el hígado y el cerebro de las crías, que se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, se pesaron y se mantuvieron congelados a -80 °C hasta el momento de su análisis.

### 3.3.3 Experimento 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas con aceite de oliva, pescado o pescado suplementadas

En este experimento se utilizaron cinco dietas (una para cada grupo experimental): las dietas de oliva o pescado fueron iguales a las utilizadas en los experimentos anteriores (v. cuadro 3, dietas PE y O con un 10% de grasa) y además se usaron tres dietas basadas en la de aceite de pescado, suplementadas con ácido araquidónico, ácido  $\gamma$ -linolénico y vitamina E (dietas PE-AA, PE-gL y PE-10E). El diseño experimental se esquematiza en la Fig. 11:



**Fig. 11:** Diseño Experimental 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas de oliva, pescado o pescado suplementadas

- **O-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta **O** (n=4).
- **PE-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta **PE** (n=5).
- **PE-gL-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta **PE-gL** (n=5).



- **PE-AA-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta **PE-AA** (n=6).
- **PE-10E-L:** Ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta **PE-10E** (n=5).

Para este experimento se seleccionaron ratas hembras con un peso aproximado de 180-200 g que se aparearon con un macho y durante toda la gestación y lactancia (hasta 20 días después del parto) fueron alimentadas con una de las dietas descritas. En las 24 h tras el parto, las camadas se uniformizaron a 8 crías. El día en que nacieron se pesó y midió a aquellos animales que continuaron con el experimento y en los días indicados en el diseño experimental se estudió el desarrollo postnatal de las crías de la misma manera que en el experimento anterior. Se calculó también la ingesta de las madres lactantes en los días señalados en el diseño experimental (Fig. 11).

### 3.3.4 Experimento 4: Intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes

En este experimento, cada rata tomaba durante la gestación y la lactancia una misma dieta (dietas O ó PE del 10%), pero las crías se intercambiaron entre las madres, de manera que se formaron 4 grupos experimentales, como se esquematiza en la Fig. 12:

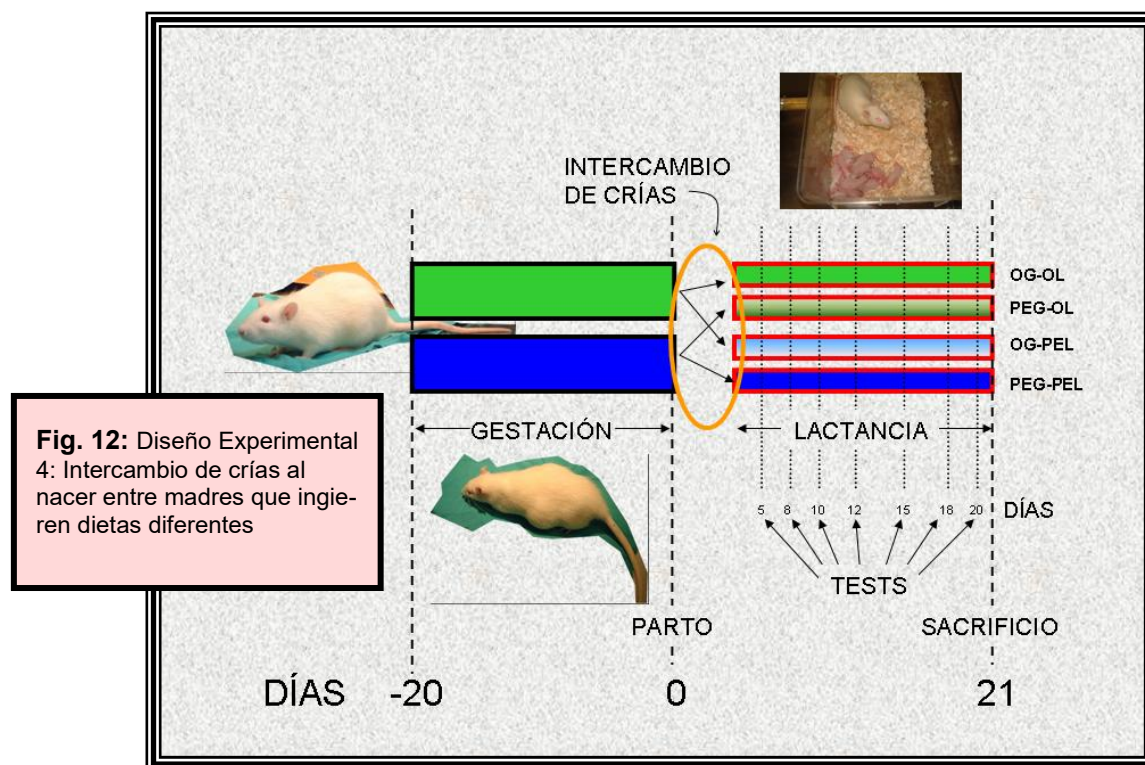
- **OG-PEL:** Crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de oliva durante la gestación, cambiadas a madres recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de pescado (n=7 camadas).
- **OG-OL:** Crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de oliva durante la gestación, cambiadas a madres recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de oliva (n=7 camadas).
- **PEG-OL:** Crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de pescado durante la gestación, cambiadas a madres recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de oliva (n=7 camadas).
- **PEG-PEL:** Crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de pescado durante la gestación, cambiadas a madres recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de pescado (n=6 camadas).

Se cruzaron ratas de un peso similar (unos 190 g) con machos de la misma cepa y desde el primer día de la gestación empezaron a tomar la correspondiente dieta, que no dejaron de tomar hasta el final del tratamiento (21 días tras el parto). Cuando parieron las camadas se uniformizaron a ocho individuos y en ese mismo día se intercambiaron las camadas entre madres

que hubieran parido en el mismo día, para formar los cuatro grupos experimentales descritos. Especial atención tuvimos en intercambiar de madres a las crías de los grupos PEG-PEL y OG-OL, ya que, aunque las madres respectivas eran alimentadas con la misma dieta durante la gestación y la lactancia, era importante realizar el intercambio para descartar en los resultados cualquier efecto debido a la variación de la madre.

Una vez intercambiadas las camadas, se dejó crecer a las crías y se determinaron los parámetros indicadores del desarrollo postnatal descritos en el apartado 3.1.2.2 en los días fijados previamente.

Entre los días 7 y 8 y entre los días 14 y 15 se cuantificó la producción de leche mediante el método descrito en el apartado 3.1.2.3. En el día 12 se obtuvo una muestra de leche según el método descrito en el apartado 3.1.2.4 y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta el día en que se analizó el contenido de vitamina E.



En el día 21 de la lactancia se sacrificó a las madres y a las crías mediante decapitación y se recogió la sangre en EDTA- $\text{Na}_2$ , juntando la sangre de todas las crías de una misma camada. Posteriormente se separó el plasma como en experimentos anteriores. Se extrajeron hígado y cerebro de las crías, e hígado, glándula mamaria y tejido adiposo de las madres, que fueron inmediatamente congelados en  $\text{N}_2$  líquido y, una vez pesados, se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### 3.3.5 Experimento 5: Destino de la vitamina E en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E.

En este experimento se combinó la dieta suplementada con vitamina E (200 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol/kg seco, el doble que en los experimentos anteriores), con la situación de diabetes inducida por STZ. Puesto que la IDDM sin control metabólico produce una gran pérdida de peso, se prefirió trabajar con animales más grandes, por lo que se seleccionaron 43 machos de la cepa SD de un peso aproximado de 380 g, repartidos en los siguientes grupos experimentales:

- **O-2E**: Ratas controles alimentadas durante 20 días con la dieta **O-2E** (n=9), de aceite de oliva suplementada con vitamina E.
- **O-2E-D**: Ratas diabéticas alimentadas durante 20 días con la dieta **O-2E** (n=6).
- **G-2E**: Ratas alimentadas durante 20 días con la dieta **G-2E** (n=9), de aceite de girasol suplementada con vitamina E.
- **G-2E-D**: Ratas diabéticas alimentadas durante 20 días con la dieta **G-2E** (n=6).
- **PE-2E**: Ratas alimentadas durante 20 días con la dieta **PE-2E** (n=9), de aceite de pescado suplementada con vitamina E.
- **PE-2E-D**: Ratas diabéticas alimentadas durante 20 días con la dieta **PE-2E** (n=4).

Todos los animales empezaban a tomar la dieta *ad libitum* en el día 0, que en el caso de los animales diabéticos era el día en el que se les administra la droga, según se describe en el apartado 3.1.2.5. En el caso de los animales diabéticos, continuaban el estudio hasta el final siempre que se comprobara a los tres días que la administración de STZ había establecido la diabetes. Esta comprobación se llevaba a cabo determinando la glucosa con un analizador automático Accutrend (Boehringer, Alemania) utilizando una gota de sangre obtenida mediante punción en la vena safena.

Al inicio del día 20 se separaba a los animales en jaulas metabólicas individuales (v. Fig. 13), en las que pasaban veinticuatro horas en ayuno. Al inicio de este periodo, en cuanto terminaba el ciclo de oscuridad de los animales, se les extrajo sangre de la cola. En la Fig. 14 se esquematiza el experimento.

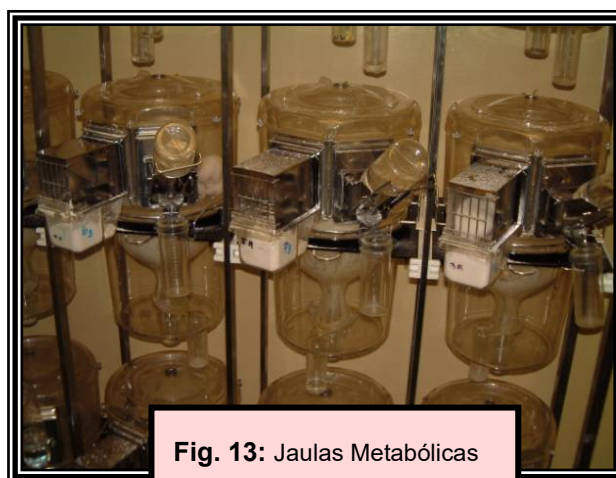
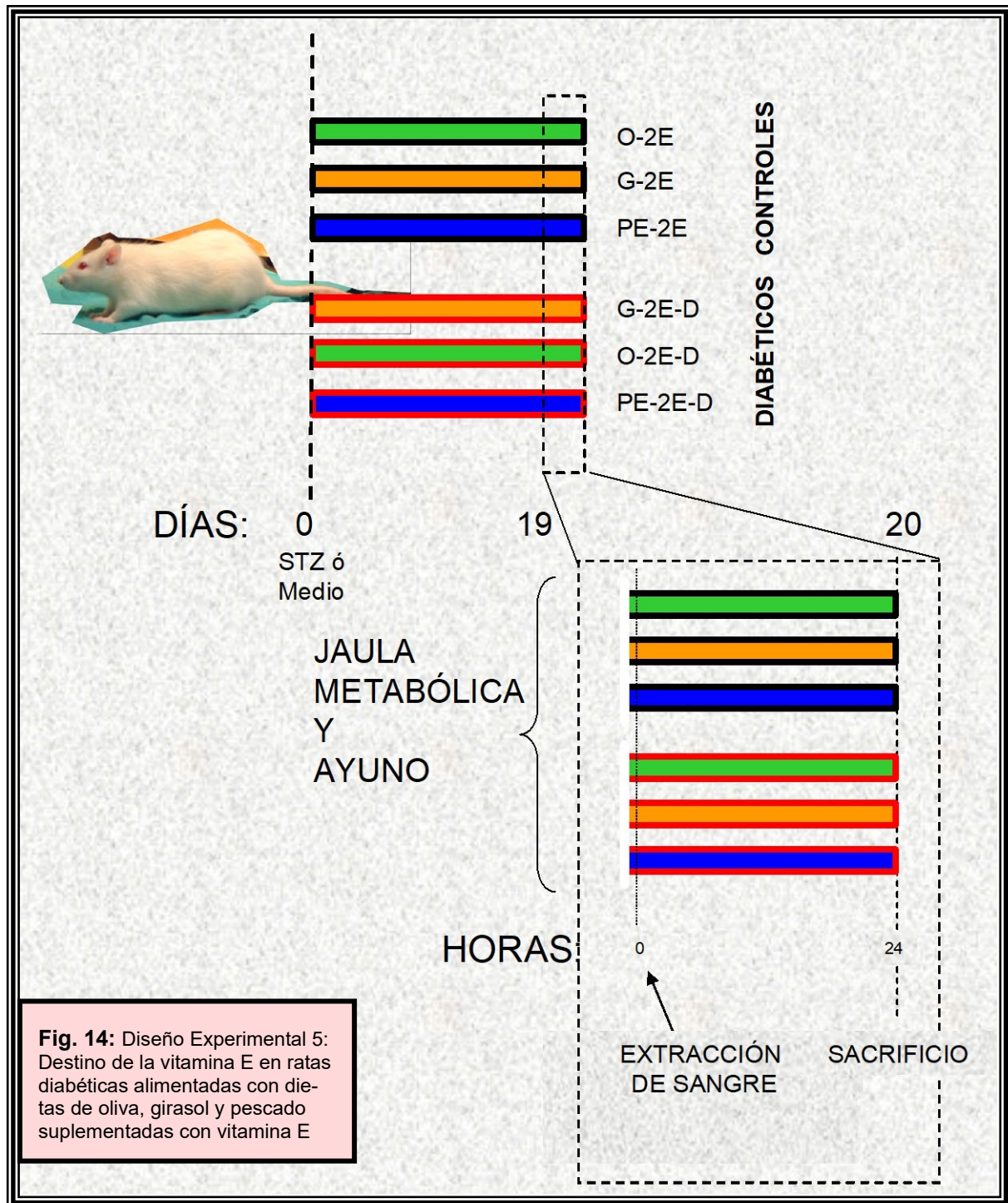


Fig. 13: Jaulas Metabólicas



Se recogió también la orina producida en el total de estas 24 horas en que los animales estaban aislados. Esta orina se recogía en tubos a los que se les había añadido una pequeña cantidad de BHT, para atenuar los posibles procesos de oxidación de la muestra. La orina así recogida se congeló en N<sub>2</sub> y posteriormente se almacenó a -80 °C hasta el día de su análisis.

Al final de las 24 horas se obtenía la sangre mediante punción cardiaca. Los animales se sacrificaban a continuación mediante dislocación cervical y se extraían hígado, tejido adiposo lum-

bar y cerebro de los animales, que eran inmediatamente congelados en N<sub>2</sub> líquido, y, una vez pesados, almacenados a -80 °C hasta el momento de su análisis.

## 3.4 Métodos Analíticos

### 3.4.1 Instrumentación

#### 3.4.1.1 HPLC

Para el análisis mediante HPLC de las muestras, se han empleado equipos equivalentes, aunque podían tener distinta configuración:

- Bombas: Se han empleado bombas Beckman (Beckman-Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) Mod. 116, 126 y 128.
- Inyector automático: Beckman Mod. 502 y 507e.
- Detector:
  - UVD: Beckman Mod. 166 (longitud de onda variable) o Mod. 168 (*diode array*)
  - FD: Waters 474 (Milford, MA, EE.UU.)
  - ED: BAS LC-4C (amperométrico) (West Lafayette, IN, EE.UU.)
  - Cuando se utilizaban los detectores de fluorescencia o electroquímico, los datos se suministraban al procesador de datos mediante una interfase Beckman AI-406
- Columna: En todos los métodos se ha trabajado con columnas de fase inversa Nucleosil C<sub>18</sub> 5 μ, 150x4.6 mm (Teknokroma, Sant Cugat del Vallès, España), termostalizadas a 35-40 °C en hornos Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.) o Gecko 2000 (Cluzeau Info-Labo, Ste. Foy La Grande, Francia)
- Los datos se recogían en ordenadores personales equipados con el *software* Beckman SystemGold v. 8.1. Este *software* es el que se utilizó también para el análisis de los cromatogramas obtenidos.

#### 3.4.1.2 Otros Equipos

- Espectrofotómetros:
  - De cubeta: Uvikon 922 (Kontron, Milan, Italia) y Beckman DU650
  - Con muestreador: Hitachi U-1000 e Hitachi U-1500 (Tokyo, Japón)
- Fluorímetro
  - Hitachi F-2000



- Sonificadores dr. hielscher UP200S, (dr. hielscher, Berlín, Alemania) y Misonix Sonicator (Misonix, Farmingdale, NY, EE.UU.)
- Evaporador centrífugo Virtis Sentry (Virtis, Gardiner, NY, EE.UU.) unido a una centrífuga Savant SpeedVac Plus SC110 (Holbrook, NY, EE.UU.)
- Centrífugas:
  - De mesa: Megafuge 1.0 R (Heraeus Instruments, Langeselbold, Alemania) y Beckman GS-6R.
  - Microfuga: Mikro 22 R (Hettich, Tuttlingen, Alemania)

### 3.4.1.3 Reactivos

Todos los disolventes empleados (etanol, metanol, cloroformo, hexano y acetona), han sido de calidad HPLC, de Scharlab (Barcelona) o de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los patrones de dl- $\alpha$ -tocoferol, acetato de  $\alpha$ -tocoferol y acetato de vitamina A han sido de Fluka (Buchs SG, Suiza); la vitamina K<sub>1</sub> de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) y el fenildodecano de Merck (Darmstadt, Alemania). El tocol fue un generoso regalo de Roche (Basilea, Suiza).

EDTA-Na<sub>2</sub> y BHT fueron de Sigma y LiClO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O, NaOOC-CH<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH de Panreac (Montcada i Reixac). Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de Prolabo (Madrid) y FeCl<sub>3</sub> y (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub> de Merck (Darmstadt, Alemania).

El H<sub>2</sub>O de las distintas disoluciones y fases móviles fue siempre de calidad ultrapura, obtenida mediante una estación Milli-Qplus 185 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.).

## 3.4.2 Determinaciones de vitamina E y productos relacionados

### 3.4.2.1 Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol en plasma, hígado, placenta, cerebro, leche, tejido adiposo y glándula mamaria de rata y dietas experimentales.

El esquema del tratamiento de muestras de los métodos para analizar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en estas muestras, que se representa en la Fig. 15, fue común y se basa en una extracción líquido-líquido con hexano, con variaciones para cada tipo de muestra, que dependen de la naturaleza de la matriz en la que se encuentra el  $\alpha$ -tocoferol [554-557]. Todos los protocolos experimentales se encuentran recogidos en el Apéndice I.

### 3.4.2.1.1 Obtención de disolución para extracción

#### 3.4.2.1.1.1 Muestras

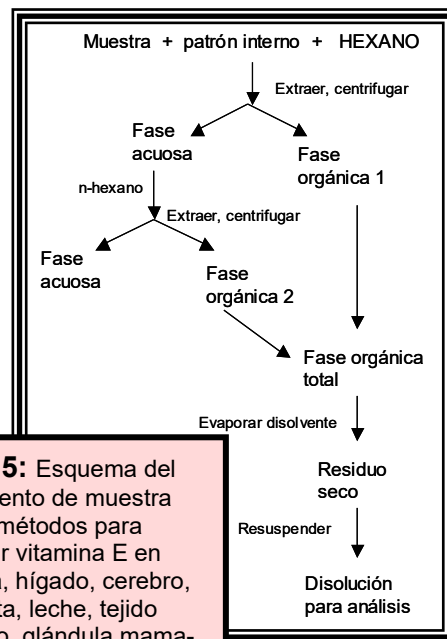
El plasma y la leche no requirieron ningún procesamiento previo a la extracción, pero a las muestras sólidas se les sometió a una homogeneización previa para tener así una muestra líquida adecuada para alicuotar. A fragmentos de hígado se les añadía un volumen de tampón fosfato 5 mM pH 7.4 igual en  $\mu\text{L}$  al peso en mg y se homogeneizaban mecánicamente en Potter. El cerebro y la placenta se procesaron igual, pero homogeneizando con más tampón fosfato: 8  $\mu\text{L}$  por cada mg de tejido. La glándula mamaria y el tejido adiposo se homogeneizaron con un medio distinto, etanol:agua 1:1 (v/v), que se añadía a una porción de tejido adiposo o a polvo de glándula mamaria (obtenido triturando en  $\text{N}_2$  líquido), en la

proporción 10  $\mu\text{L}$  por cada mg. En el caso de las dietas, la muestra líquida se obtenía directamente en el tubo de análisis con un pequeño fragmento de dieta (unos 100 mg) al que se le añadían 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de BHT 40 mM (en etanol), preparada en el día del análisis a partir de una disolución concentrada que se conservaba aislada de la luz en nevera y 200  $\mu\text{L}$  de una disolución de EDTA- $\text{Na}_2$  0.01M (aq) también preparada en el día del análisis.

En tubos de vidrio de fondo redondo se alicuotaban 200  $\mu\text{L}$  de plasma, o 50  $\mu\text{L}$  de leche más 150  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 5 mM y en ambos casos se añadían 200  $\mu\text{L}$  de etanol, 200  $\mu\text{L}$  de metanol y 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón interno correspondiente. 100  $\mu\text{L}$  de etanol, 200  $\mu\text{L}$  de metanol y 50  $\mu\text{L}$  de patrón interno también se añaden a la mezcla de dieta, BHT y EDTA y se homogeneizaba mediante sonda de ultrasonidos. En el caso del hígado se alicuotaban 50  $\mu\text{L}$  del homogeneizado y se añadían 50  $\mu\text{L}$  del patrón interno, mientras que, para placenta, cerebro, tejido adiposo y glándula mamaria, se alicuotaban 200  $\mu\text{L}$  de los respectivos homogeneizados y se les añadía 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón interno.

#### 3.4.2.1.1.2 Patrones

Disolución de almacenamiento: Se preparaban sendas disoluciones, todas en etanol, de  $\alpha$ -tocoferol (8 mg/mL), acetato de  $\alpha$ -tocoferol (8 mg/mL) y de los patrones internos acetato de vitamina A (1.2 mg/mL), vitamina  $\text{K}_1$  (0.6 mg/mL) y fenildodecano (8 mg/mL) y se almacenaban por separado a  $-20^\circ\text{C}$ .



**Fig. 15:** Esquema del tratamiento de muestra de los métodos para analizar vitamina E en plasma, hígado, cerebro, placenta, leche, tejido adiposo, glándula mamaria y dietas experimentales

En el día del análisis, se preparaban los patrones de trabajo, para lo cual se diluían con etanol las disoluciones de almacenamiento, en una proporción que variaba según la muestra a analizar: Si se iba a analizar plasma o leche se diluía la disolución de  $\alpha$ -tocoferol 1/200 (v/v), 1/750 (v/v) en el caso del hígado, 1/1000 (v/v) para el cerebro y la placenta y 1/500 (v/v) para el tejido adiposo y glándula mamaria. Para analizar el contenido en vitamina E de las dietas experimentales se preparaba una disolución con  $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol juntos, diluidos 1/800 y 1/267 (v/v), respectivamente.

El patrón interno y las diluciones que se empleaban en cada caso fueron las siguientes: para plasma, acetato de vitamina A 1/100 (v/v), para hígado, placenta y cerebro se utilizaba la vitamina K<sub>1</sub> sin diluir y diluida 1/5 (v/v) para tejido adiposo y glándula mamaria y fenildodecano, diluido 1/20, para los análisis de leche y dietas experimentales. Hay que tener en cuenta que en hígado, placenta y cerebro, junto con la vitamina E, que se analizaba por fluorescencia, se analizaban distintas formas de vitamina A mediante la señal que daban en el detector UV y la cantidad de vitamina K se ajustaba para que diera una señal intermedia a la de todos los analitos en ambos canales de detección. En tejido adiposo y glándula mamaria sólo se analizaba la vitamina E por fluorescencia.

Las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol y de acetato de  $\alpha$ -tocoferol de las correspondientes disoluciones de patrón de trabajo se determinaban espectrofotométricamente en el día del análisis, según sus respectivos coeficientes de extinción en etanol,  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 294 nm para el  $\alpha$ -tocoferol y  $\epsilon = 2057 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 284 nm para el acetato de  $\alpha$ -tocoferol.

En tubos de vidrio de fondo redondo se alicuotaban 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón de trabajo correspondiente y 200  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 5 mM (si se analizaban plasma, leche, hígado, cerebro, o placenta) o etanol:agua 1:1 (v/v) (si se analizan tejido adiposo o glándula mamaria). Los patrones de valoración de las dietas se preparaban con 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón de trabajo, 100  $\mu\text{L}$  de agua, 50  $\mu\text{L}$  de BHT 40 mM, 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de patrón interno, 200  $\mu\text{L}$  de metanol y 200  $\mu\text{L}$  de EDTA 10 mM.

#### **3.4.2.1.2 Extracción-evaporación-resuspensión**

Los patrones y las muestras se procesaban en paralelo: Se añadía a todos los tubos 1 mL de n-hexano y se extraía la fracción liposoluble, mediante agitación intensa en el caso del plasma y mediante sonicación con sonda en el resto. Todos los tubos se centrifugaban a 500 g durante 5 min y el sobrenadante se separaba en tubos nuevos. Este proceso de extracción-centrifugación se repetía y se juntaban los dos extractos. El disolvente se evaporaba a continuación mediante vacío en evaporador centrífugo y el residuo seco se resuspendía en 200  $\mu\text{L}$  de metanol en el caso del plasma, 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol 1:2 (v/v) para la leche, 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol 1:1 para la placenta, cerebro y dietas, 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol 1:3

para el hígado, 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol 1:1 para el tejido adiposo y 750  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol 1:1 para la glándula mamaria.

### 3.4.2.1.3 Condiciones cromatográficas

La cromatografía se llevaba a cabo utilizando como fase móvil metanol:agua, desde 97.5:2.5 (v/v) hasta 94:6 (v/v), a un flujo constante de 2.0 mL/min, en las columnas de fase inversa ya descritas. El volumen de inyección era en general 25  $\mu\text{L}$ , excepto en el plasma que era 40  $\mu\text{L}$ .

La detección se llevaba a cabo en UVD a 325 nm para el acetato de vitamina A, a 260 nm para el fenildodecano, a 295 nm para el  $\alpha$ -tocoferol y a 284 nm para el acetato de  $\alpha$ -tocoferol. En fluorescencia la vitamina K<sub>1</sub> absorbe radiación a 268 nm y emite a 330 nm, el fenildodecano absorbe a 260 nm y emite a 600 nm y el  $\alpha$ -tocoferol absorbe a 295 nm y emite a 350 nm.

Para cuantificar el  $\alpha$ -tocoferol y el acetato de  $\alpha$ -tocoferol en las muestras, el patrón de trabajo se analizó junto con las muestras y la proporción de las áreas de las picos fue usada para realizar los cálculos siguiendo el método del patrón interno. Por motivos desconocidos, el fenildodecano, con una pureza certificada >99%, originaba dos picos en el cromatograma de fluorescencia, pero esto no afectaba a los cálculos, pues se podía cuantificar en función del área de cualquiera de los dos picos, o de la suma de las áreas (datos no presentados).

### 3.4.2.2 Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol en aceite.

Las disoluciones *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y de vitamina K se preparaban igual que en los métodos anteriores:  $\alpha$ -tocoferol (8 mg/mL) y vitamina K (0.6 mg/mL), ambas en etanol.

En el día del análisis, la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol se diluye 1/20 con etanol y de esta nueva disolución se tomaba 1 mL que se llevaba a 10 mL con cloroformo:metanol 1:1. El patrón interno no se diluye. La concentración de la disolución patrón en etanol se determinaba espectrofotométricamente, según el coeficiente de extinción del  $\alpha$ -tocoferol en etanol a 294 nm,  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Se pesaba exactamente una cantidad de aceite lo más próxima posible a 100 mg, se añadían 500  $\mu\text{L}$  de patrón interno y se enrasaba a 10 mL con cloroformo:metanol 1:1. Se disolvía bien el aceite y se inyectaban alícuotas de 40  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo.

Los patrones se procesaban de la misma forma, usando 1 mL de la disolución patrón en vez de aceite y 500  $\mu\text{L}$  de patrón interno y llevando a 10 mL con cloroformo:metanol 1:1.

La cromatografía se llevaba a cabo usando metanol:agua 96.5:3.5 (v/v) como fase móvil a un flujo constante de 2.0 mL/min. La detección se llevaba a cabo por la fluorescencia específica del  $\alpha$ -tocoferol (absorción a 294 nm, emisión a 350 nm) y de la vitamina K (absorción a 330 nm y emisión a 400 nm).

Para cuantificar el  $\alpha$ -tocoferol en las muestras, el patrón de trabajo fue siempre analizado junto con las muestras y la proporción de las áreas de los picos fue usada para realizar los cálculos siguiendo el método del patrón interno.

### **3.4.2.3 Método de valoración de $\alpha$ -tocoferol, $\alpha$ -tocoferol quinona y $\alpha$ -tocoferol hidroquinona en sangre total.**

#### **3.4.2.3.1 Síntesis de $\alpha$ -tocoferol quinona a partir de $\alpha$ -tocoferol**

La disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol se preparaba en una concentración aproximada de 20-40 mg/mL en etanol. A partir de ésta se preparaba una dilución 1/50 utilizando como disolvente la fase móvil que se usará para la cromatografía. Se transfería esta disolución a una célula electroquímica. Como electrodo de trabajo, se empleaba una malla de platino, el electrodo auxiliar o contraelectrodo era una lámina de platino, separada de la disolución dentro de un tubo con frita porosa con tapón de agar rellena de KCl 3M. Para oxidar el  $\alpha$ -tocoferol se aplicaba un potencial constante de +0.6V durante al menos 4 horas. La disolución resultante se almacena a -20 °C hasta el día del análisis.

#### **3.4.2.3.2 Síntesis de $\alpha$ -tocoferol hidroquinona a partir de $\alpha$ -tocoferol quinona**

Se preparaba una célula coulombimétrica de mercurio pesando aproximadamente 70 g de Hg en una célula especial que permitía conectar el Hg con el electrodo. Se añadían 25 mL de la disolución de  $\alpha$ -tocoferol quinona y se burbujeaba con N<sub>2</sub> durante 15 min para desplazar el oxígeno disuelto. Se introducía el electrodo auxiliar de lámina de Pt directamente en la disolución y el electrodo de referencia en puente salino con tapón de agar. Con agitación constante se aplicaba un potencial de -0.30 V durante 2-3 horas, hasta que la pendiente de la coulombimetría era constante. La disolución resultante se almacenaba a -20 °C hasta el día del análisis.

### **3.4.2.4 Análisis de $\alpha$ -tocoferol, $\alpha$ -tocoferol quinona y $\alpha$ -tocoferol hidroquinona**

#### **3.4.2.4.1 Disoluciones previas**

La disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol se preparaba igual que en todos los ensayos anteriores: 8 mg/mL en etanol; el patrón interno era el tocol, que se preparaba también en etanol (3 mg/mL) y se almacenaban por separado a -20°C.

Las disoluciones *stock* de  $\alpha$ -tocoferol quinona y de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona eran las resultantes del proceso de síntesis y se almacenaban por separado a -20 °C.

Además se preparaban sendas disoluciones de EDTA- $\text{Na}_2$  0.2 g/mL (aq) y de BHT 200 mM en etanol y tampón fosfato 5 mM. En el día del análisis, a partir de la disolución *stock* de BHT, se preparaba una disolución 0.8  $\mu\text{M}$  en acetona. Esta era la disolución de trabajo de BHT.

#### 3.4.2.4.1.1 Muestras

Una vez obtenida la sangre, se mezclaba con el EDTA en la proporción de 2 partes de sangre por cada parte de EDTA (v/v). De esa mezcla se tomaban 200  $\mu\text{L}$ , que se echaban en un tubo eppendorf en el que previamente se habían alicuotado 350  $\mu\text{L}$  de la disolución de BHT 0.8  $\mu\text{M}$  en acetona y 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de tocol.

#### 3.4.2.4.1.2 Patrones

Se preparaban dos tipos de patrones, por separado: uno para la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona y otro para el  $\alpha$ -tocoferol y la  $\alpha$ -tocoferol quinona

En un matraz se diluía 1/500 (v/v) el *stock* de tocol y se enrasaba con acetona y esta era la disolución de trabajo de tocol. En otro matraz se diluía 1/1000 la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, se enrasaba con acetona y ésta era la disolución de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona. En el último se diluían 1/1000 la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol quinona y 1/250 la de  $\alpha$ -tocoferol y se enrasaba con acetona, ésta era la disolución de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol y de  $\alpha$ -tocoferol quinona.

Las concentraciones de las disoluciones patrón de  $\alpha$ -tocoferol y de  $\alpha$ -tocoferol quinona en etanol se determinaban espectrofotométricamente en disoluciones independientes preparadas de forma paralela, pero en etanol, según los coeficientes de extinción, del  $\alpha$ -tocoferol en etanol,  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 294 nm y de la  $\alpha$ -tocoferol quinona  $\epsilon = 19730 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 268 nm.

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona se determinaba electroquímicamente: En la célula de medida se preparaban 100 mL de una disolución de perclorato de tetraetilamonio 0.050M en acetonitrilo. Se sumergía la malla de Pt, el electrodo auxiliar de lámina de Pt en el puente relleno con la misma disolución (y tapón de agar en el extremo) y el electrodo de referencia en puente salino relleno con KCl 3M (y tapón de agar). Con agitación constante se aplicaba un potencial de +0.40 V y se esperaba a que la corriente alcanzara un valor constante. Entonces se añadían, con micropipeta, 100  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona. Se debía producir un aumento brusco de la corriente y un descenso exponencial hasta hacerse constante. Mediante el área bajo la curva se cuantificaba la cantidad de hidroquinona en la disolución

Los patrones se procesaban igual que las muestras, pero con 200  $\mu\text{L}$  de una disolución EDTA:tampón fosfato 5 mM 1:2 (v/v) en vez de sangre, 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de trabajo correspondiente ( $\alpha$ -tocoferol hidroquinona o  $\alpha$ -tocoferol quinona más  $\alpha$ -tocoferol), 300  $\mu\text{L}$  de la

disolución de BHT 0.8 mM y 50  $\mu$ L de la disolución de patrón interno.

#### **3.4.2.4.1.3 Procesamiento de patrones y muestras**

Se sonicaban todos los tubos eppendorf y se centrifugaban a 11840 g durante 1 min. El sobrenadante se trasvasaba a viales de cromatografía para su posterior análisis.

#### **3.4.2.4.1.4 Cromatografía**

La cromatografía se llevaba a cabo usando metanol y una fase acuosa en la proporción 92:8 (v/v) como fase móvil a un flujo constante de 2.0 mL/min. La fase acuosa era una disolución de LiClO<sub>4</sub> 150 mM y NaOOC-CH<sub>3</sub>/HOOC-CH<sub>3</sub> 50 mM en agua ultrapura.

La detección se llevaba a cabo por la corriente de oxidación que se produce a 700 mV vs Ag/AgCl. Los analitos pasaban previamente por un electrodo que estaba aplicando un potencial de reducción de -350 mV. La señal se transformaba hasta un rango de 0.1  $\mu$ A y se le aplicaba un filtro de 0.2 Hz.

Para cuantificar el  $\alpha$ -tocoferol en las muestras, el patrón de trabajo era siempre analizado junto con las muestras y la proporción de las áreas de los picos era utilizada para realizar los cálculos siguiendo el método del patrón interno.

### **3.4.3 Validaciones**

#### **3.4.3.1 Valoración de vitamina E en tejido adiposo**

Todas las muestras preparadas para la validación se procesaron con el método descrito en el apartado 3.4.2.1 y detallado en el apéndice I. La validación se llevó a cabo en dos días distintos, a los que se hace referencia como día 1 y día 2.

La estabilidad del  $\alpha$ -tocoferol en disolución y en muestras biológicas ha sido extensivamente estudiada por otros autores [451, 554], por lo que no se consideró necesario en nuestro estudio. Los tejidos, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se conservaban a -80 °C y siempre se analizaron antes de que hubiera transcurrido un mes desde su obtención.

##### **3.4.3.1.1 Linealidad de patrones**

La linealidad de la curva patrón se verificó mediante el análisis de dos series de 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L del patrón de trabajo (aproximadamente 0.032 mg/mL), que se llevaron a 200  $\mu$ L con etanol, añadiéndose 200  $\mu$ L de agua y 50  $\mu$ L de la disolución de trabajo del patrón interno. Tras el procesamiento de extracción, evaporación y resuspensión se analizaron por HPLC y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas. La linealidad de patrones se realizó en el día 1.

Dado que el método implicaba extracción y concentración del  $\alpha$ -tocoferol, la representación de la nube de puntos se llevó a cabo tomando como abscisas la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol correspondiente a la disolución patrón empleada expresada en  $\mu\text{g}$ , en vez de en unidades de concentración, y, como ordenadas, el cociente de las áreas (expresadas en unidades arbitrarias) de los picos respectivos del  $\alpha$ -tocoferol y de la vitamina K (patrón interno), resultantes de la separación cromatográfica y de la detección específica por fluorescencia. Estas cantidades de  $\alpha$ -tocoferol correspondían a una concentración en el vial que se analizó en el cromatógrafo desde 0.6 hasta 4.8 mg/L.

Se realizó un análisis de la regresión de los resultados obtenidos, para obtener los principales parámetros que permitieran evaluar la linealidad.

#### **3.4.3.1.2 Linealidad de muestras**

El ensayo de linealidad de muestras se llevó a cabo analizando dos series de 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{L}$  de homogeneizados de tejido. Todas las muestras se llevaron a 400  $\mu\text{L}$  con etanol:agua 1:1 y se les añadió el patrón interno. Este ensayo se realizó en el día 1.

La representación de la nube de puntos realizó tomando como abscisas la cantidad de tejido que hay en cada tubo (expresado en mg), pues se esperaba que la distribución de vitamina E fuera homogénea en las muestras y la cantidad de analito proporcional al volumen de homogeneizado. Como ordenadas, el cociente de las áreas (expresadas en unidades arbitrarias) de los picos respectivos del  $\alpha$ -tocoferol y de la vitamina K, resultantes de la separación cromatográfica y de la detección específica por fluorescencia.

Los resultados se analizaron estadísticamente para evaluar la linealidad.

#### **3.4.3.1.3 Precisión**

La precisión se determinó valorando en dos días distintos la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que había en 12 alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ , 6 cada día, de un mismo homogeneizado, que se mantuvo congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre las dos valoraciones. En cada uno de los días, las muestras fueron valoradas frente a patrones que se prepararon en el día correspondiente. Las alícuotas y los patrones fueron procesados de la forma descrita en el apartado 3.4.2.1.

Se evaluó la precisión mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de los datos de cada uno de los días (repetitividad) y conjuntamente (precisión intermedia).

#### **3.4.3.1.4 Exactitud**

El experimento de exactitud se hizo añadiendo a una cantidad constante de homogeneizado (100  $\mu\text{L}$ ) cantidades crecientes (12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$ ) del patrón de trabajo, es decir, una cantidad conocida de  $\alpha$ -tocoferol. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de agua y etanol hasta completar 400



$\mu\text{L}$  y a todos los tubos se les añadió el patrón interno y se procesaron como ya se ha descrito. Los resultados se representaron en forma de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol valorado frente al  $\alpha$ -tocoferol teórico, que se calculó sumando la cantidad añadida, que era conocida, más la cantidad que se encontró en el ensayo de linealidad de muestras para el volumen de homogeneizado que se utilizó.

Se evaluó la exactitud mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de la recuperación en cada uno de los niveles y mediante el análisis de la regresión de la cantidad recuperada frente a la teórica.

### **3.4.3.2 Valoración de vitamina E en glándula mamaria**

La validación del método de análisis de  $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria fue muy similar a la del tejido adiposo, con diferencias fundamentalmente en los rangos de  $\alpha$ -tocoferol ensayados. Los detalles de este método están descritos en el apartado 3.4.2.1 y en el Apéndice I. Al igual que con el tejido adiposo, los tejidos se analizaron antes de que pasara un mes desde su extracción y estuvieron congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ese momento.

#### **3.4.3.2.1 Linealidad de patrones**

La linealidad de la curva patrón se verificó mediante el análisis de dos series de 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$  del patrón de trabajo (aproximadamente 0.08 mg/mL), que se llevaron a 200  $\mu\text{L}$  con etanol, añadiéndose 200  $\mu\text{L}$  de agua y patrón interno. La linealidad de patrones se realizó en el día 1.

También en este método se evaluó la linealidad de la señal (cociente de áreas) frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol, no la concentración y la evaluación de la regresión se realizó de la misma forma. Estas cantidades de  $\alpha$ -tocoferol correspondían a una concentración en el vial que se analizó en el cromatógrafo desde 1.25 hasta 10 mg/L.

#### **3.4.3.2.2 Linealidad de muestras**

El ensayo de linealidad de muestras se llevó a cabo analizando dos series de 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{L}$  de homogeneizados de tejido. Todas las muestras se llevaron a 400  $\mu\text{L}$  con etanol:agua 1:1, se les añadió el patrón interno y se procesaron como se ha descrito. Este ensayo se realizó en el día 1.

La linealidad se evaluó representando la señal frente a los mg de muestra que hay en cada tubo y se analizó la regresión como de costumbre.

#### **3.4.3.2.3 Precisión**

La precisión se determinó valorando en dos días distintos la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que había

en 12 alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ , 6 cada día, de un mismo homogeneizado, que se mantuvo congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre las dos valoraciones. En cada uno de los días, las muestras fueron valoradas frente a patrones que se prepararon en el día correspondiente. Las alícuotas y los patrones fueron procesados de la forma descrita en el apartado 3.4.2.1.

Se evaluó la precisión mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de los datos de cada uno de los días (repetitividad) y conjuntamente (precisión intermedia).

#### **3.4.3.2.4 Exactitud**

El experimento de exactitud se hizo añadiendo en distintos tubos a 100  $\mu\text{L}$  de homogeneizado 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{L}$  del patrón de trabajo. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de agua y etanol hasta completar 400  $\mu\text{L}$  y a todos los tubos se les añadió el patrón interno y se procesaron como ya se ha descrito. Los resultados se representaron en forma de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol valorado frente al  $\alpha$ -tocoferol teórico.

Se evaluó la exactitud mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de la recuperación en cada uno de los niveles y mediante el análisis de la regresión de la cantidad recuperada frente a la teórica.

#### **3.4.3.3 Valoración de vitamina E en aceites**

Todas las muestras preparadas para la validación se procesaron con el método descrito en el apartado 3.4.2.2 y detallado en el apéndice I. Dado que las muestras nunca se almacenaron, sino que se empleaban para fabricar las dietas en el mismo día en que se abrían, no se consideró necesario estudiar la estabilidad en la muestra más allá de las conclusiones que se pueden obtener del estudio de la precisión intermedia.

##### **3.4.3.3.1 Linealidad de patrones**

El ensayo de linealidad de curva patrón se realiza valorando cantidades crecientes conocidas (250, 500, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{L}$ ) del patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol (0.4 mg/mL), al que se añade el patrón interno y se completa en todos los casos el volumen hasta 10 mL con cloroformo:metanol 1:1 (v/v).

También en este método se evaluó la linealidad de la señal (cociente de áreas) frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol y la regresión se analizó como de costumbre. Estas cantidades de  $\alpha$ -tocoferol correspondían a una concentración en el vial que se analizó en el cromatógrafo desde 0.2 hasta 1.3 mg/L.

##### **3.4.3.3.2 Linealidad de muestras**

Para realizar este ensayo, previamente se preparó una disolución concentrada de muestra,

disolviendo aproximadamente 1 g en 10 mL de cloroformo:metanol 1:1 (v/v). El ensayo de linealidad de muestras se realizó analizando 250, 500, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{L}$  de esa disolución de muestra, que se llevan a 10 mL con cloroformo:metanol 1:1 (v/v). Esta dilución intermedia de muestra se realizó para minimizar las variaciones de volumen de disolvente en cada una de las muestras y que no afectaran a la concentración. Este ensayo se hizo en el día 1.

La representación de la nube de puntos se llevó a cabo tomando como abscisas la cantidad de aceite en el matraz y como ordenadas, el cociente de las áreas de los picos respectivos del  $\alpha$ -tocoferol y de la vitamina K. Se analizó la regresión mediante los algoritmos habituales.

### **3.4.3.3.3 Precisión**

Estos parámetros se determinaron valorando en dos días distintos la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que hay en 12 alícuotas de 100 mg, 6 cada día, de un mismo aceite, que se mantuvo en el refrigerador hasta el momento de su valoración. En cada uno de los días, las muestras fueron valoradas frente a patrones que se prepararon en el día del análisis. La media de la concentración medida y su dispersión fueron evaluadas estadísticamente para determinar la repetitividad y la precisión intermedia.

### **3.4.3.3.4 Exactitud**

El experimento de exactitud se hizo añadiendo a una cantidad constante (500  $\mu\text{L}$ ) de la dilución intermedia de aceite que se ha indicado en el apartado de la linealidad de muestras de este método cantidades crecientes (125, 250, 500, 750, 1000  $\mu\text{L}$ ) del patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol. Los resultados se representaron en forma de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol valorado frente al  $\alpha$ -tocoferol teórico.

Se evaluó la exactitud mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de la recuperación en cada uno de los niveles y mediante el análisis de la regresión de la cantidad recuperada frente a la teórica.

### **3.4.3.4 Valoración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol) en dietas**

Este método comparte la estructura común ya descrita en el apartado 3.4.2.1 y está detallado en el apéndice I, pero en su validación hubo que introducir pequeñas variaciones para poder adecuar las proporciones de todos los reactivos para todos los niveles de analito y de muestra ensayadas, teniendo en cuenta, además, la amplia variabilidad posibilidad en el rango de concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en la muestra, que depende del tipo de grasa empleada.

#### **3.4.3.4.1 Linealidad de patrones $\alpha$ -tocoferol**

Se prepararon tres diluciones de la disolución "stock": 1/2000, 1/400 y 1/133 (v/v), que equiva-

len a concentraciones aproximadas de 0.004, 0.02 y 0.06 mg/mL, respectivamente. La linealidad de la curva patrón se verificó, mediante el análisis de dos series de 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L de la dilución 1/2000; 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L de la dilución 1/400 y 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L de la 1/133, que se llevaron a 100  $\mu$ L con etanol, añadiéndose además el BHT, patrón interno, metanol, EDTA y agua en la proporción descrita en el apartado 3.4.2.1.

Tras el procesamiento y análisis, se representaron los valores obtenidos y se analizaron las regresiones de las respectivas señales (cociente de áreas en UV y cociente de áreas en fluorescencia) frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol. Se analizaron los trece puntos en ambos detectores, pero sólo se pudieron obtener dos representaciones de once puntos cada una, pues en el detector ultravioleta los dos primeros puntos no daban señal apreciable y en el detector de fluorescencia los dos últimos saturaban la señal. Las concentraciones correspondientes en el vial de análisis fueron, por tanto, en UV, desde 0.51 hasta 15.2 mg/L y en fluorescencia, desde 0.13 mg/L hasta 12.6 mg/L.

#### **3.4.3.4.2 Linealidad de patrones acetato $\alpha$ -tocoferol**

Para verificar la linealidad del acetato de  $\alpha$ -tocoferol se analizaron dos series de 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L del patrón de trabajo (concentración aproximada 0.15 mg/mL) que se llevaron a 100  $\mu$ L con etanol, añadiéndose además el BHT, patrón interno, metanol, EDTA y agua en la proporción descrita en el apartado 3.4.2.1.

Se procesaron y analizaron y se obtuvo la regresión del cociente de áreas frente a la cantidad de acetato de  $\alpha$ -tocoferol, que fue analizada. Las concentraciones respectivas en los viales analizados iban desde 4.7 hasta 37.9 mg/L.

#### **3.4.3.4.3 Linealidad de muestras**

El ensayo de linealidad de muestras se llevó a cabo analizando dos series de 160, 325, 650, 975 y 1300  $\mu$ L de homogeneizado de dieta, preparado como se describe en el apartado 3.4.2.1. Todas las muestras se llevaron a 1400  $\mu$ L con las cantidades correspondientes de etanol, BHT, patrón interno, metanol, EDTA y agua, de manera que en todos los tubos se mantuviera la proporción etanol:metanol:agua 1:1:1.5 (v/v/v).

Tras el procesamiento y análisis se obtuvieron tres regresiones frente a la cantidad de muestra en el tubo: la de  $\alpha$ -tocoferol en fluorescencia, la de  $\alpha$ -tocoferol en ultravioleta y la de acetato de  $\alpha$ -tocoferol, siempre corregidas las áreas por las del patrón interno de cada cromatograma. Estas regresiones fueron evaluadas como siempre.

#### **3.4.3.4.4 Precisión de $\alpha$ -tocoferol y de acetato de $\alpha$ -tocoferol**

Estos parámetros se determinan valorando en dos días distintos la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol y de

acetato de  $\alpha$ -tocoferol que hay en 12 alícuotas de 550  $\mu$ L, 6 cada día, de un mismo homogeneizado, que se mantuvo a 4 °C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> entre los dos días hasta el momento de su valoración. En cada uno de los días, las muestras fueron valoradas frente a patrones que se prepararon en el día del análisis.

#### **3.4.3.4.5 Exactitud de $\alpha$ -tocoferol**

Para llevar a cabo el experimento de exactitud se preparó un homogeneizado de dieta, con BHT, metanol, EDTA y agua, preparado de manera que 550  $\mu$ L de homogeneizado tuviera aproximadamente 50 mg de dieta (un 50% de una muestra normal). El experimento de exactitud se hizo añadiendo a esa cantidad constante de homogeneizado cantidades crecientes de las diluciones en etanol correspondientes de la disolución de trabajo y así, se añadió  $\alpha$ -tocoferol a dos series de doce muestras, desde 12.5 ng hasta 3  $\mu$ g y se completó en todos los tubos hasta 650  $\mu$ L con etanol. Se calcularon el  $\alpha$ -tocoferol teórico y el  $\alpha$ -tocoferol encontrado y el cociente entre ambos expresaba la recuperación.

Se evaluó la recuperación media, la dispersión de la recuperación y además se analizó la regresión del  $\alpha$ -tocoferol medido frente al teórico.

#### **3.4.3.4.6 Exactitud de acetato de $\alpha$ -tocoferol**

Se utilizó el mismo homogeneizado de dieta descrito en el apartado anterior y se añadió a cinco tubos con una cantidad constante de homogeneizado (550  $\mu$ L) cantidades crecientes de las diluciones en etanol correspondientes de la disolución "stock" y así, se añadió acetato de  $\alpha$ -tocoferol a cinco muestras, desde 1.5  $\mu$ g hasta 12.1  $\mu$ g y se completó en todos los tubos hasta 650  $\mu$ L con etanol. Los cálculos que se realizaron para evaluar la exactitud son idénticos a los ya descritos.

#### **3.4.3.4.7 Estabilidad de la vitamina E en las dietas**

Aunque no era necesario para demostrar la validez del método, se realizó un experimento para comprobar la estabilidad de ambas formas de vitamina E en las condiciones en las que se administraba la dieta a los animales experimentales (descritas en el apartado 1.1).

Para ello se midió el contenido en vitamina E en las dietas frescas, recién preparadas. Una vez preparadas, las dietas eran inmediatamente congeladas. A los quince días de haber sido congelada, se sacó una porción de la dieta que se iba a valorar y se dejó descongelar a 4°C durante una noche. Una vez descongelada, se midió por triplicado el contenido en vitamina E y se dejó expuesta a las condiciones de luz, temperatura y humedad del animalario, durante dos días, al cabo de los cuales se volvió a valorar por triplicado el contenido de vitamina E.

### 3.4.3.5 Valoración de $\alpha$ -tocoferol en sangre

Todas las muestras preparadas para la validación se procesaron con el método descrito en el apartado 3.4.2.3 y detallado en el apéndice I.

#### 3.4.3.5.1 Linealidad de patrones

La linealidad de la curva patrón se verificó mediante el análisis de dos series de 12.5, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L del patrón de trabajo (aproximadamente 0.008 mg/mL), que se llevaron a 350  $\mu$ L con acetona, BHT y patrón interno, añadiéndose 200  $\mu$ L de tampón fosfato.

Nuevamente se evaluó la linealidad de la señal (cociente de áreas) frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol y el análisis de la regresión se realizó de la misma forma que en las otras validaciones. Estas cantidades de  $\alpha$ -tocoferol correspondían a una concentración en el vial que se analizó en el cromatógrafo desde 0.12 hasta 1.2 mg/L.

#### 3.4.3.5.2 Precisión

Por las especiales características de la muestra y el objetivo del análisis, que era poder valorar  $\alpha$ -tocoferol en la sangre inmediatamente obtenida, no se consideró necesario el estudio de precisión intermedia, pero sí se determinó la repetitividad, valorando la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que había en 6 alícuotas de una misma muestra de sangre mezclada con EDTA, tal y como se describe en el apartado 2.4.2.3.

Se evaluó la precisión mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de los datos.

#### 3.4.3.5.3 Exactitud

El experimento de exactitud se hizo añadiendo en distintos tubos 5, 12, 25, 50 y 75  $\mu$ L del patrón de trabajo a 100  $\mu$ L de mezcla sangre-EDTA. Se añadieron 100  $\mu$ L de tampón fosfato-EDTA (mezclado en la misma proporción que la sangre), acetona y BHT hasta completar 600  $\mu$ L. A todos los tubos se les añadió el patrón interno y se procesaron como ya se ha descrito. Los resultados se representaron en forma de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol valorado frente al  $\alpha$ -tocoferol teórico.

Se evaluó la exactitud mediante análisis estadístico de la media y la dispersión de la recuperación en cada uno de los niveles y mediante el análisis de la regresión de la cantidad recuperada frente a la teórica.

### 3.4.4 Determinaciones complementarias

#### 3.4.4.1 Triglicéridos en plasma

La concentración de triglicéridos se determinó en plasma siguiendo el método enzimático colorimétrico descrito por Buccolo y David [558], utilizando el kit comercial de la casa Menarini (Italia).

#### 3.4.4.2 Colesterol en plasma

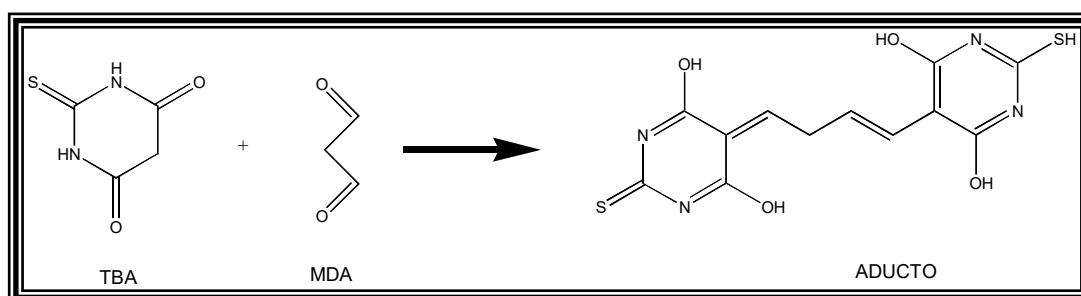
La concentración de colesterol se determinó en plasma siguiendo el método enzimático colorimétrico descrito por Allain *et al.* [559], utilizando el kit comercial de la casa Menarini (Italia).

#### 3.4.4.3 Glucosa en plasma

La determinación de glucosa plasmática se realizó mediante el método enzimático colorimétrico basado en el descrito por Hugget y Nixon [560], utilizando el kit comercial de Boehringer-Manheim (Alemania).

#### 3.4.4.4 TBARS en plasma

El ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el MDA, para dar un aducto fluorescente (Fig. 16). El aducto formado tiene un color rosado característico y puede cuantificarse su concentración mediante su absorbancia a  $\lambda = 515$  nm, o su fluorescencia, a  $\lambda_{\text{ex}} = 515$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 553$  nm. El protocolo detallado para esta determinación se encuentra en el apéndice I.

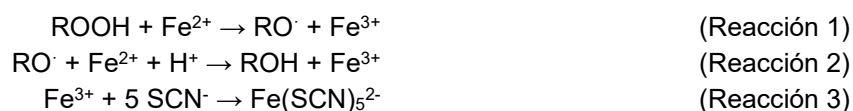


**Fig. 16:** Reacción del MDA con el TBA

Aunque el MDA no es la única molécula plasmática que puede reaccionar con el TBA, esta determinación se considera como un valor de referencia para la estimación del daño inducido por estrés oxidativo sobre las estructuras lipídicas.

### 3.4.4.5 Hidroperóxidos en plasma

La determinación de hidroperóxidos plasmáticos se llevó a cabo mediante el kit comercial de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), con pequeñas modificaciones, como se registra en el protocolo detallado en el apéndice I. En esencia, el método consiste en extraer los hidroperóxidos en cloroformo, para usar a continuación el extracto en un ensayo que se basa en las reacciones redox de los hidroperóxidos con el ion ferroso:



El  $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$  da un color rosado característico a la disolución y puede cuantificarse mediante fotometría a  $\lambda = 500 \text{ nm}$ , pues la absorbancia de la disolución es directamente proporcional a la cantidad de hidroperóxidos que hubiera en la disolución muestra.

### 3.4.4.6 Isoprostanos en orina

Este ensayo está basado en la reacción entre el 8-IP y un conjugado de 8-IP con acetilcolinesterasa (trazador de 8-IP), que compiten por unirse a un número limitado de sitios de unión de 8-IP, anticuerpos específicos obtenidos a partir de suero de conejo. La acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis de la acetiltiocolina, cuyo producto reacciona con el ácido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico para dar ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que absorbe luz a  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . De esta forma, la cantidad de luz absorbida es inversamente proporcional a la cantidad de 8-IP en la muestra. El ensayo se realizaba mediante el kit comercial de la casa Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), con pequeñas modificaciones que se recogen en el protocolo detallado en el apéndice I.

### 3.4.4.7 Creatinina en orina

La orina se diluía cinco veces con agua destilada y la muestra así obtenida se analizaba mediante un analizador automático de creatinina (Creatinine Analyzer 2, Beckman), que cuantifica la creatinina mediante su reacción con el ácido pícrico, según el método de Jaffé [561].

### 3.4.4.8 Determinación de ácidos grasos

El método se basa en la extracción de los lípidos de las muestras según el método de Folch [453] y su posterior transesterificación para su conversión en los correspondientes derivados metílicos. Los ácidos grasos así derivatizados se determinaron mediante cromatografía de gases y los resultados se expresan como porcentaje de cada uno de los ácidos grasos sobre el total. Esta determinación la llevó a cabo la Dra. Encarnación Amusquívar, siguiendo el protocolo descrito en la Memoria de su tesis doctoral [562].

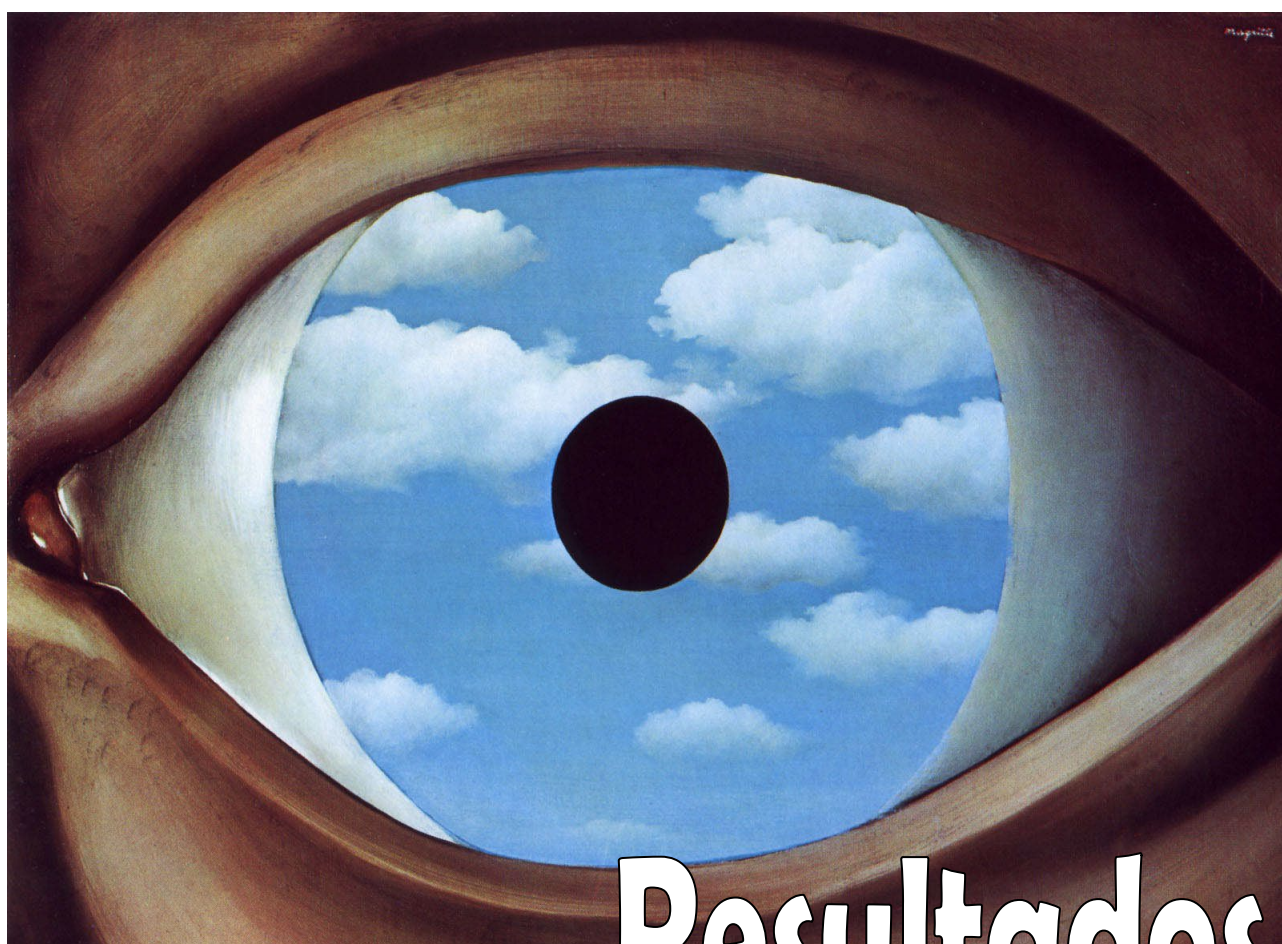


### 3.4.5 Análisis estadístico

Para evaluar los datos de las validaciones de los métodos puestos a punto y validados por nosotros se obtuvieron los estadísticos correspondientes mediante el programa Excel XP (Microsoft, EE.UU.).

Todos los demás datos derivados de los experimentos con animales fueron analizados mediante el programa StatGraphics PLUS 5.0 (Manugistics Inc., EE.UU.). Los datos han sido analizados mediante ANOVAs de una, dos o tres vías y los tests de comparación de medias empleados tras los correspondientes ANOVAS han sido el de Student-Newman-Keuls y el LSD (*Least Significant Difference*).





# Resultados



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Validaciones de métodos analíticos

#### 4.1.1 Método para medir $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo

En la Fig. 17 se presentan cromatogramas representativos del análisis de patrones y muestras de tejido adiposo. Tras obtener los resultados analíticos, se calcularon los parámetros de la validación, resumiéndose los más relevantes en el Cuadro 5. Dichos resultados se discuten a continuación.

##### 4.1.1.1 Linealidad de $\alpha$ -tocoferol

En la Fig. 18 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (vitamina K), frente a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. El coeficiente de correlación,  $r$ , es superior a 0.99, suficiente para ser aceptado, en función de la concentración de analito en la muestra, entre 0.01 y 0.001% (p/p).

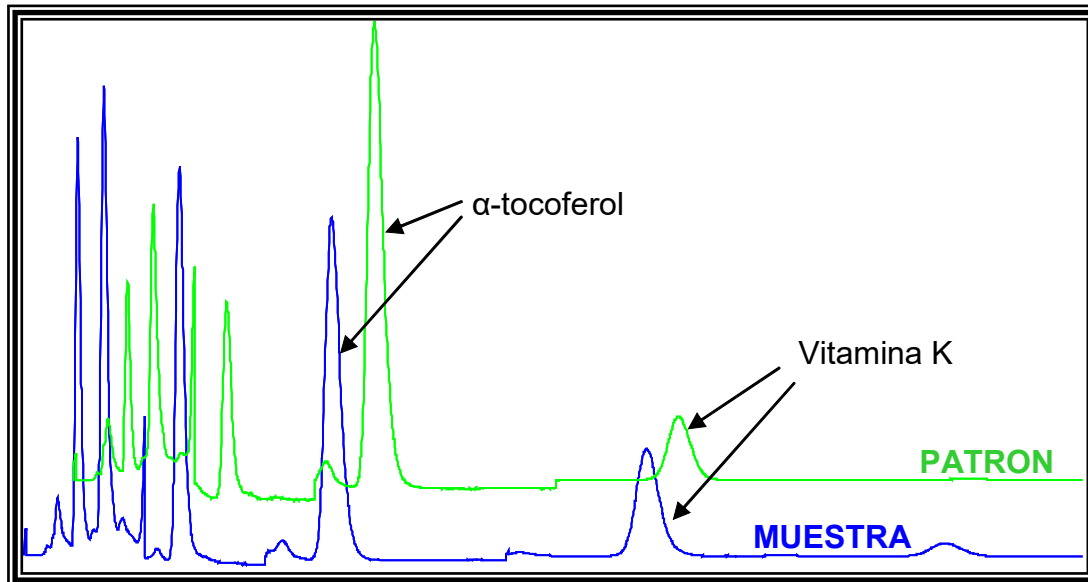
Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  intervalos de confianza (I.C.) no incluye el valor 0;  $t_b$  ( $b/S_b$ , 49.6) es mayor que  $t_{tab}$  (2.306), con una probabilidad del 95% y la RSD del factor de respuesta (3%) es inferior al 5%, y, aunque no es inferior al 2%, está dentro de los límites que se pueden considerar admisibles para el nivel de analito en la muestra.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la ordenada en el origen (O.O.)  $\pm$  I.C. incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  ( $a/S_a$ , 0.45) es inferior a  $t_{tab}$ (2.306).

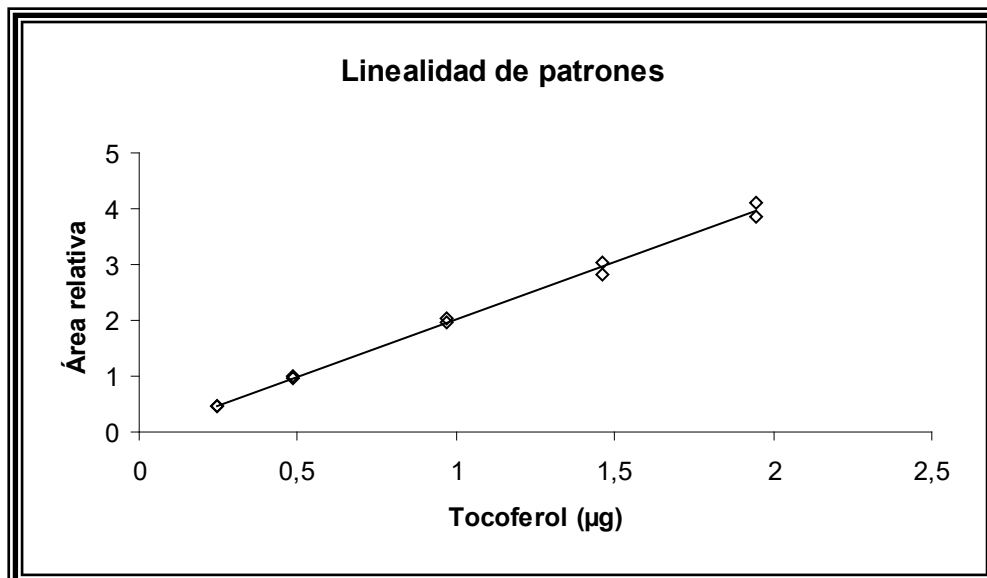
##### 4.1.1.2 Linealidad de muestra

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y como  $t_b$  (65.8) es mucho mayor que 2.306 se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%. El factor de respuesta ( $0.132 \pm 0.008$ ), aunque un poco menor, es semejante a la pendiente de la recta de regresión. Sin embargo, su RSD es 9%, dentro de unos límites aceptables, pero algo elevado. En la observación de los datos individuales se aprecia una ligera tendencia a que el factor de respuesta sea más elevado cuando aumenta la cantidad de muestra, lo que apunta a una posible pérdida de respuesta cuando se trabaja con pequeñas muestras.

Test de proporcionalidad: I.C. para la O.O. no incluyen el 0 y la  $t_a$  (8.5) es mayor que  $t_{tab}$ , por lo que hay que aceptar que la recta de regresión de la linealidad de muestra tiene sesgo. Este sesgo está en consonancia con el hecho de que el factor de respuesta disminuya con la cantidad de muestra y ambos hechos indican que no se debe trabajar con cantidades de muestra inferiores a 18 mg de tejido (volumen de homogeneizado 200  $\mu$ L).



**Fig. 17:** Cromatogramas representativos de patrón y muestras de tejido adiposo



**Fig. 18:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocopherol en el método para medir  $\alpha$ -tocopherol en tejido adiposo

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		0.243 - 1.94	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.0 $\pm$ 0.1	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq$ 0	2.0 $\pm$ 0.1	Cumple
		r	$\geq$ 0.990	0.998	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		4.54 - 36.4	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.019 $\pm$ 0.002	No cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq$ 0	0.145 $\pm$ 0.005	Cumple
		r	$\geq$ 0.990	0.9996	Cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	95	Cumple
		RSD (%)	< 7.3	3	Cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq$ 6	6	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		49 $\pm$ 2	
		RSD (%)	< 7.3	4.5	Cumple
	Precisión inter-media	n	$\geq$ 12	12	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		53 $\pm$ 4	
		RSD (%)	< 2 · RSD <sub>dia1+dia2</sub>	9	No Cumple

**Cuadro 5:** Principales parámetros de la validación del método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo

#### 4.1.1.3 Exactitud

Cuando se contrasta la hipótesis de que se recupera el 100% del  $\alpha$ -tocoferol que hay en la muestra, la hipótesis nula es que la media de las recuperaciones es el 100% de la vitamina E que hay. En este caso hay que rechazarla, pues la diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (95%) es superior al I.C. de la media ( $t_{\text{tab}} \cdot s/\sqrt{n}$ , 2%), al 95%. De todas formas, es lo suficientemente cercano al 100% como para aceptar el método.

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (34.1) es muy superior a  $t_{\text{tab}}$  (2.306). De forma complementaria, se puede realizar un contraste de hipótesis en el que no se contraste la hipótesis nula de la igualdad a 0, sino que se desee saber si se puede aceptar que la pendiente sea 1. El valor de  $t_{\text{exp}}$  en este caso (1.9) es inferior a 2.306, por lo que hay que rechazar que la pendiente sea 1. Esto se demuestra de forma más intuitiva por el hecho de que aunque la pendiente de la recuperación (0.95) sea muy cercana a 1, pendiente  $\pm$  I.C. (0.02) no incluye el 1 y todos estos datos están de acuerdo con lo ya explicado al hablar de la recuperación media de este método.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. sí incluye el 0 y se puede aceptar la hipótesis de que  $\alpha = 0$  al 95% ( $0.03 < 2.306$ ) y que por tanto no hay sesgo en la recuperación.

#### 4.1.1.4 Precisión

La repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.005\%$ ), pues los coeficientes de variación de ambos días (4.4% y 4.5%) son menores del 5%. En el Cuadro 2 se recogen los límites admitidos para la precisión de un método y en ella se observa que esta precisión cumple incluso con el valor máximo aceptado de la AOAC, que es el más restrictivo.

La precisión intermedia, sin embargo, no resulta tan buena, pues el coeficiente de variación de la media conjunta de los días no es inferior (aunque por poco) al doble de la media de los coeficientes de variación obtenidos en cada uno de los días. La media de los valores obtenidos el segundo día (49  $\mu\text{g/g}$ ) es inferior a la del primer día, por lo que se puede suponer que parte del  $\alpha$ -tocoferol se ha podido oxidar, aunque el homogeneizado se guardara en frío y este descenso justifica la pérdida de la precisión intermedia.

#### 4.1.1.5 Consideraciones finales

En la aplicación del método en ensayos de rutina se deberá tener en cuenta que no se debe trabajar con menos de 200  $\mu\text{L}$  de homogeneizado. Si fuera necesario disminuir la cantidad de muestra porque la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol fuera muy grande y saturara la señal, sería preferible estudiar otras estrategias, como disminuir el volumen de inyección en el cromatógrafo, o aumentar la proporción de medio de homogeneización por cada mg de muestra, o aumentar el volumen de resuspensión de muestra. Parece también importante que el homogeneizado se analice en el mismo día en que se prepara, para minimizar las posibles pérdidas por degradación.

### 4.1.2 Método para medir $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria

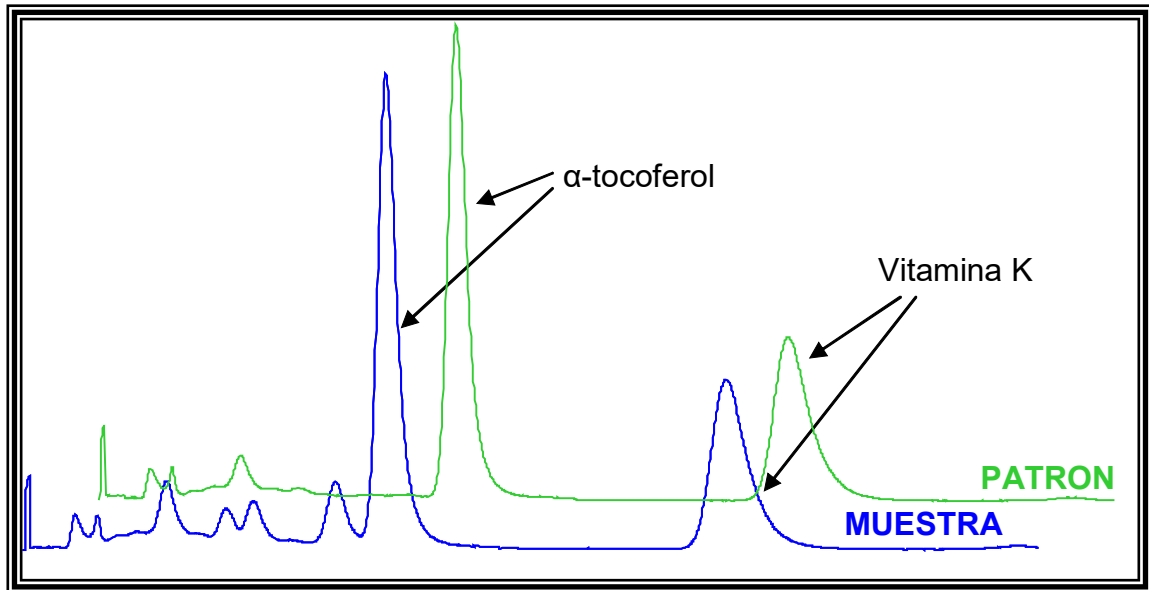
En la Fig. 19 se presentan cromatogramas representativos del análisis de patrones y muestras de glándula mamaria. Tras obtener los resultados analíticos, se calcularon los parámetros de la validación y los más importantes están resumidos en el Cuadro 6. Se presentan a continuación los comentarios más relevantes acerca de la validación.

#### 4.1.2.1 Linealidad de $\alpha$ -tocoferol

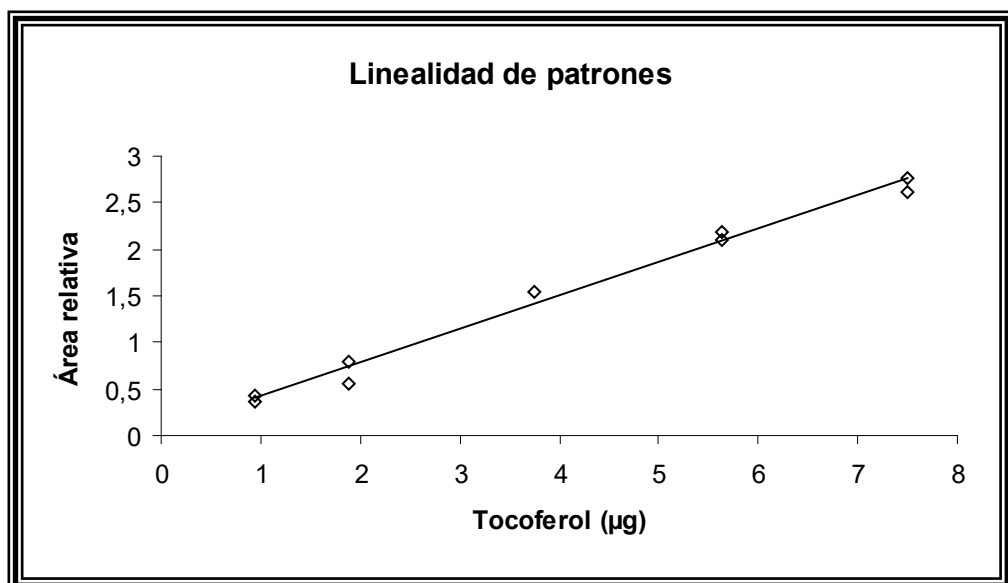
En la Fig. 20. se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (vitamina K), frente a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. El coeficien-



te de correlación,  $r$ , es superior a 0.99, suficiente para ser aceptado, en función de la concentración de analito en la muestra, entre 0.1 y 0.01% (p/p).



**Fig. 19:** Cromatogramas representativos de patrón y muestras de glándula mamaria



**Fig. 20:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para medir  $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		0.94 - 7.51	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.05 $\pm$ 0.07	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	0.36 $\pm$ 0.02	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.994	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		4.54 - 36.4	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.01 $\pm$ 0.05	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	0.31 $\pm$ 0.07	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.992	Cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	100	Cumple
		RSD (%)	< 7.3	8	No cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq 6$	6	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		177 $\pm$ 6	
		RSD (%)	< 5.3	3	Cumple
	Precisión inter-media	n	$\geq 12$	11	No cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		205 $\pm$ 22	
		RSD (%)	< $2 \cdot \text{RSD}_{\text{día1}+\text{día2}}$	15	No Cumple

**Cuadro 6:** Principales parámetros de la validación del método para medir  $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria

Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (5.2) es mayor que  $t_{\text{tab}}$  (2.365), con una probabilidad del 95%. A pesar de esto, la RSD del factor de respuesta (12%) no es satisfactoria y advierte de posibles desviaciones de la linealidad. Basándonos en toda la experiencia acumulada sobre la linealidad de la respuesta del  $\alpha$ -tocoferol no se consideró pertinente repetir el experimento, pues, en esencia, es idéntico al de la validación anterior, pero con distinto rango y se ha considerado el que la RSD del factor de respuesta sea tan alta como una anomalía analítica puntual.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, con un 95% de confianza, pues  $t_a$  (0.2) es inferior a  $t_{\text{tab}}$  (2.365).

#### 4.1.2.2 Linealidad de muestra

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y  $t_b$  (23) es mayor que 2.306, por lo que se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%.

El factor de respuesta (0.072) es semejante a la pendiente de la recta de regresión (0.070). Sin embargo, su RSD es 6.8%, dentro de unos límites aceptables, pero algo elevado. En la observación de los datos individuales se aprecia una ligera tendencia a que el factor de respuesta disminuya ligeramente cuando aumenta la cantidad de muestra, lo que indica una posible pérdida de respuesta cuando se trabaja con muestras más grandes.

Test de proporcionalidad: Los límites de confianza para la O.O. incluyen el 0 y la  $t_a$  (0.2) es menor que  $t_{tab}$ , por lo que se puede rechazar el que la recta de regresión de la linealidad de muestra tenga sesgo.

#### 4.1.2.3 Exactitud

Se puede aceptar la hipótesis de que se recupera el 100% del  $\alpha$ -tocoferol que hay en la muestra, pues la diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (100%) es inferior al I.C. de la media (6%), al 95%.

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (21.4) es muy superior a  $t_{tab}$  (2.306). Si se contrasta la igualdad de la pendiente a 1, se debe rechazar la hipótesis nula, pues el valor de  $t_b$  en este caso (4.1) es superior a 2.306. Esto se demuestra de forma más intuitiva por el hecho de que la pendiente de la recuperación (0.84) es muy cercana a 1, pero pendiente  $\pm$  I.C. (0.09) no incluyen el 1. Aunque pueda parecer sorprendente que la recuperación sea 100% y la pendiente no incluya el valor 1, estos datos tienen sentido por la RSD de la recuperación (8%), que lleva a los puntos a dispersarse demasiado alrededor de la recta.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. no incluye el 0 y se debe rechazar la hipótesis de que  $a = 0$  al 95% ( $2.5 > 2.306$ ). El sesgo en la recuperación se debe a que en los puntos más altos la recuperación es más baja, por lo que la O.O. aumenta. Esto está en consonancia con todos los demás datos que se han descrito acerca de la recuperación de este método.

#### 4.1.2.4 Precisión

La repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.02\%$ ), pues los coeficientes de variación de ambos días son menores del 4%. Estos valores cumplen incluso con el valor máximo aceptado de la AOAC.

La precisión intermedia, sin embargo, no resulta tan buena, pues el coeficiente de variación de la media conjunta de los días es muy alto. Dado que el experimento se realizó en días distintos sobre el mismo homogeneizado, que la precisión de ambos días fue prácticamente igual y que la cantidad encontrada en el segundo día era inferior a la del primero, lo que nos indica este

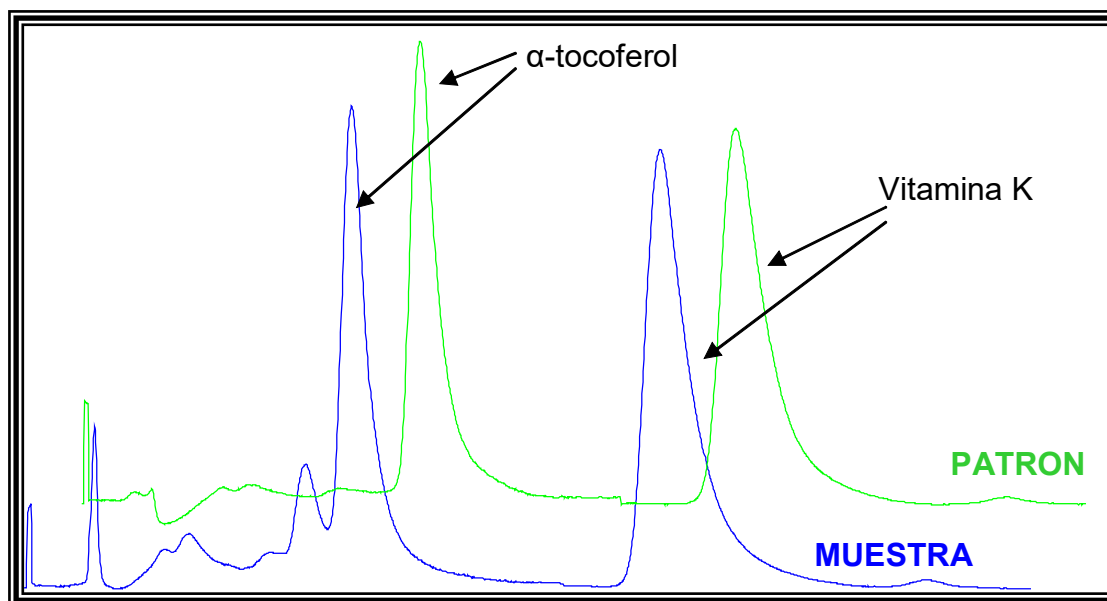
experimento es que, al igual que ocurría con el tejido adiposo, no se debe medir en un día distinto al que se homogeneiza el tejido.

#### 4.1.2.5 Consideraciones finales

La cantidad de tejido con la que se trabaja es, también en este tejido, un parámetro a considerar cuando se aplique el método en ensayos de rutina. Pero al contrario que en el adiposo, las precauciones se deben tener en cuenta si se desea trabajar con una cantidad grande de muestra. Si se desea obtener más señal deberían ensayarse otras estrategias. De nuevo se observa que no se debe medir en un día distinto al de la preparación de la muestra, para no tener pérdidas incontroladas.

#### 4.1.3 Método para medir $\alpha$ -tocoferol en aceite

En la Fig. 21 se presentan cromatogramas representativos del análisis de patrones y muestras de aceite. Al igual que en casos anteriores, a continuación se resumen los principales parámetros de validación (Cuadro 7) y los comentarios correspondientes.



**Fig. 21:** Cromatogramas representativos de patrón y muestras de aceite.

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		5.05 - 30.3	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.00 $\pm$ 0.06	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq$ 0	0.074 $\pm$ 0.003	Cumple
		r	$\geq$ 0.9990	0.9992	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		2.52 - 20.2	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.0 $\pm$ 0.2	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq$ 0	0.13 $\pm$ 0.01	Cumple
		r	$\geq$ 0.9990	0.998	No cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	98	Cumple
		RSD (%)	< 3.7	3	Cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq$ 6	6	Cumple
		Media (mg/100 g) $\pm$ I.C.		17.2 $\pm$ 0.4	
		RSD (%)	< 5.3	2	Cumple
	Precisión inter-media	n	$\geq$ 12	12	Cumple
		Media (mg/g) $\pm$ I.C.		16 $\pm$ 3	
		RSD (%)	< 2 · RSD <sub>día1+día2</sub>	6	No Cumple

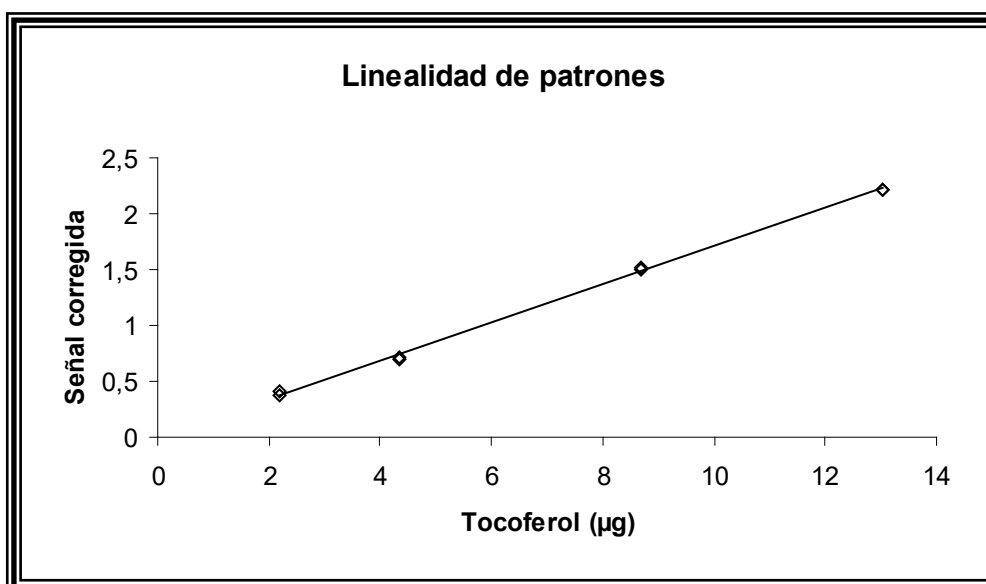
**Cuadro 7:** Principales parámetros de la validación del método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en aceite

#### 4.1.3.1 Linealidad de $\alpha$ -tocoferol

En la Fig. 22 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (vitamina K), frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol. El coeficiente de correlación, r, es superior a 0.999, suficiente para ser aceptado, en función de la concentración de analito en la muestra, entre 0.1 y 0.01% (p/p).

Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (62) es mayor que  $t_{\text{tab}}$  (2.447) y la RSD del factor de respuesta, que coincide con la pendiente, (0.074  $\pm$  0.001) es inferior al 2% (1.3%).

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  (0.12) es inferior a  $t_{\text{tab}}$  (2.447).



**Fig. 22:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en aceite

#### 4.1.3.2 Linealidad de muestra

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y como  $t_b$  (28.5) es mucho mayor que 2.306 se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%. El factor de respuesta ( $0.126 \pm 0.008$ ) es semejante a la pendiente de la recta de regresión ( $0.132 \pm 0.007$ ). Sin embargo, su RSD es 9%, dentro de unos límites aceptables, pero algo elevado. En la observación de los datos individuales se observa una ligera tendencia a que el factor de respuesta sea más elevado cuando aumenta la cantidad de muestra, hasta llegar a un máximo, lo que apunta a una posible pérdida de respuesta cuando se trabaja con pequeñas muestras.

Test de proporcionalidad: O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y  $t_a$  (0.5) es mayor que  $t_{tab}$ , por lo que se puede rechazar que la recta de regresión de la linealidad de muestra tenga sesgo.

#### 4.1.3.3 Exactitud

La diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (98%) es inferior al I.C. de la media (5%), al 95% y la RSD de la recuperación (3%) está por debajo del límite máximo admitido por la AOAC (3.7%).

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (10.1) es mayor que  $t_{tab}$  (2.306). Se puede aceptar además que la pendiente sea 1, pues  $t_b$  (0.1) es inferior a 2.306.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y se puede aceptar la hipótesis de que  $\alpha = 0$  al 95% ( $1.2 < 2.306$ ) y que por tanto no hay sesgo en la recuperación.

#### 4.1.3.4 Precisión

La repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.01\%$ ), pues los coeficientes de variación de ambos días son menores del 3%, por lo que cumplen incluso con las especificaciones de la AOAC

El coeficiente de variación de la media conjunta de los días es sólo ligeramente superior al doble de la media de los coeficientes de variación obtenidos en cada uno de los días (5.8% frente a 5.5%), por lo que puede aceptarse esta variabilidad entre días. Dado que el valor encontrado en el segundo día es ligeramente inferior al del primero, puede pensarse que la variabilidad no es sólo debida a parámetros exclusivamente analíticos, sino que es posible que, una vez abierto el recipiente en el que se almacena el aceite, parte del  $\alpha$ -tocoferol se degrada progresivamente.

#### 4.1.3.5 Consideraciones finales

A la vista de los datos de la linealidad de muestra y de la precisión, no debería intentarse analizar menos de 100 mg de muestra y la muestra debería ser lo más fresca posible.

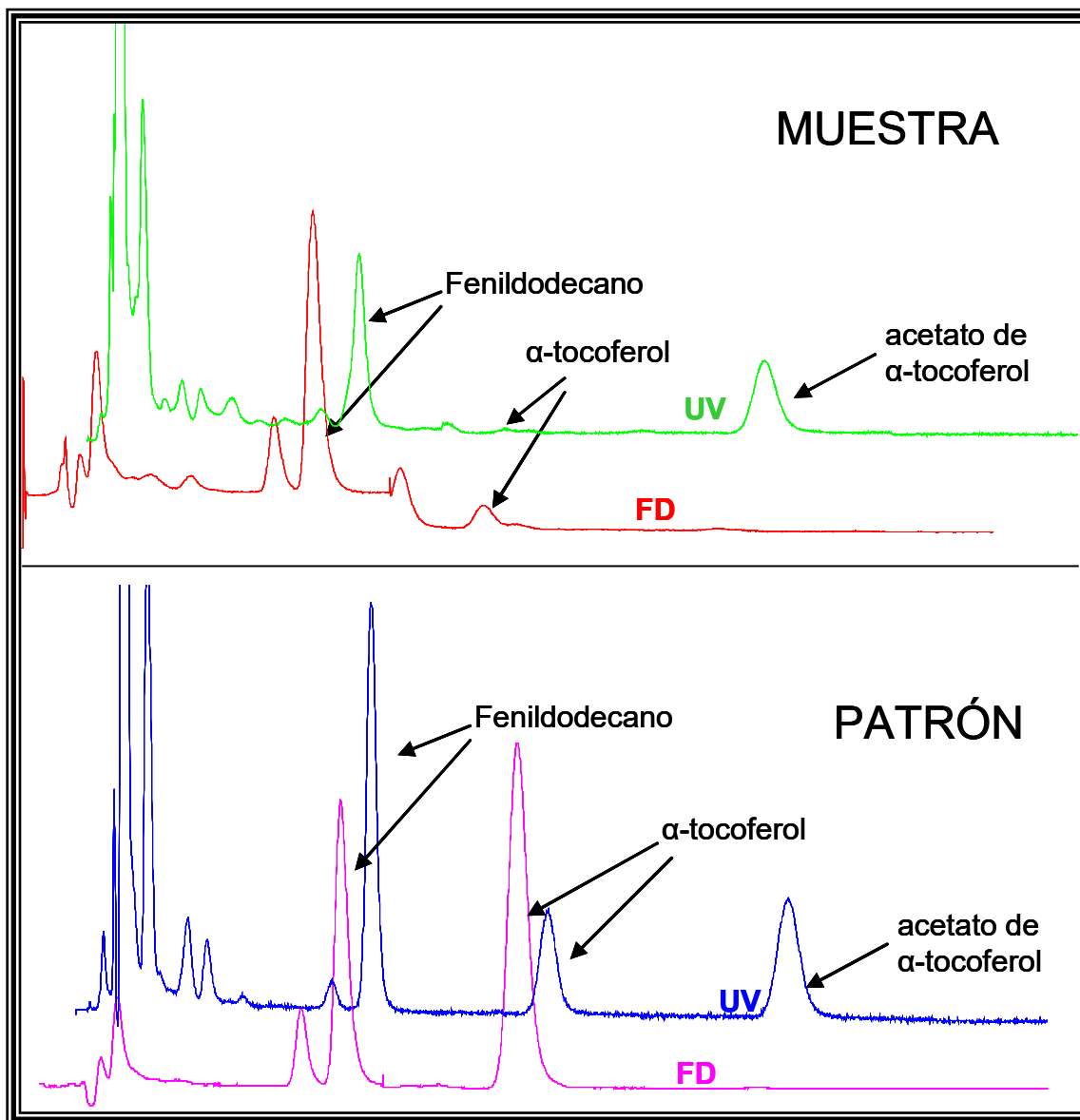
El método así validado fue aplicado a 6 muestras aleatorias de grasa de palma, aceite de girasol, oliva y pescado y los resultados se resumen en el Cuadro 8.

Aceite (grasa)	Concentración de $\alpha$ -tocoferol (mg/100 g)
<b>PALMA</b>	1.10 $\pm$ 0.06
<b>GIRASOL</b>	63.8 $\pm$ 3
<b>OLIVA</b>	18.1 $\pm$ 0.9
<b>PESCADO</b>	20.0 $\pm$ 0.7

**Cuadro 8:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en los aceites empleados en nuestros experimentos.

#### 4.1.4 Método para medir vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol) en dietas

En la Fig. 23 se presentan cromatogramas representativos del análisis de patrones y muestras de dietas. Los parámetros de validación (Cuadros 9, 10 y 11) y su discusión se recogen a continuación.

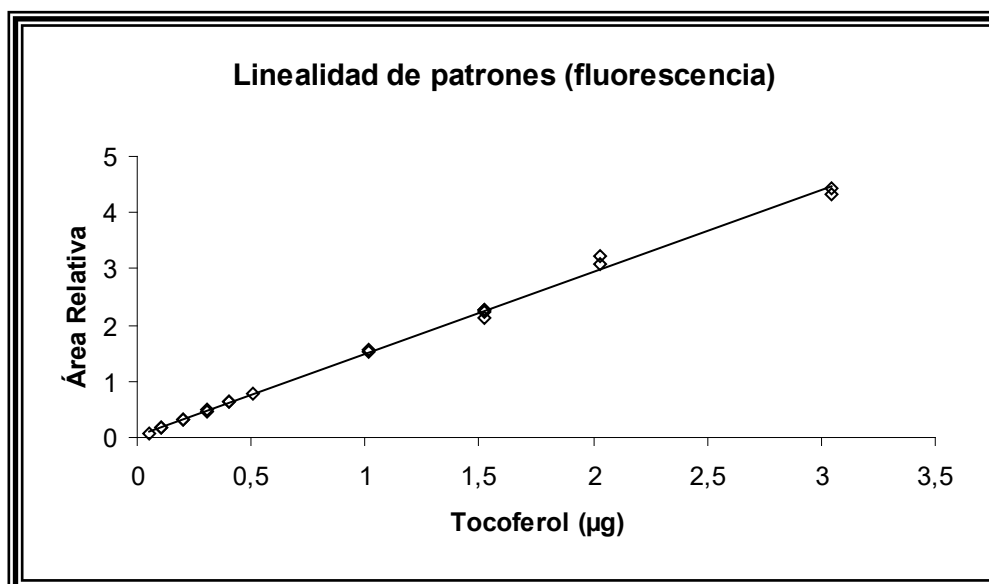


**Fig. 23:** Cromatogramas representativos de patrón y muestras de dietas, obtenidos mediante UVD y FD.



Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		0.507 - 3.04	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	$-0.03 \pm 0.05$	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	$1.46 \pm 0.03$	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.9990	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		2.52 - 20.2	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	$-0.02 \pm 0.08$	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	$0.0181 \pm 0.0007$	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.9992	Cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	88	Cumple
		RSD (%)	$< 7.3$	9	No cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq 6$	6	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		$17.0 \pm 0.7$	
		RSD (%)	$< 7.3$	4	Cumple
	Precisión inter-media	n	$\geq 12$	11	No cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		$16.5 \pm 0.5$	
		RSD (%)	$< 2 \cdot \text{RSD}_{\text{día1}+\text{día2}}$	5	Cumple

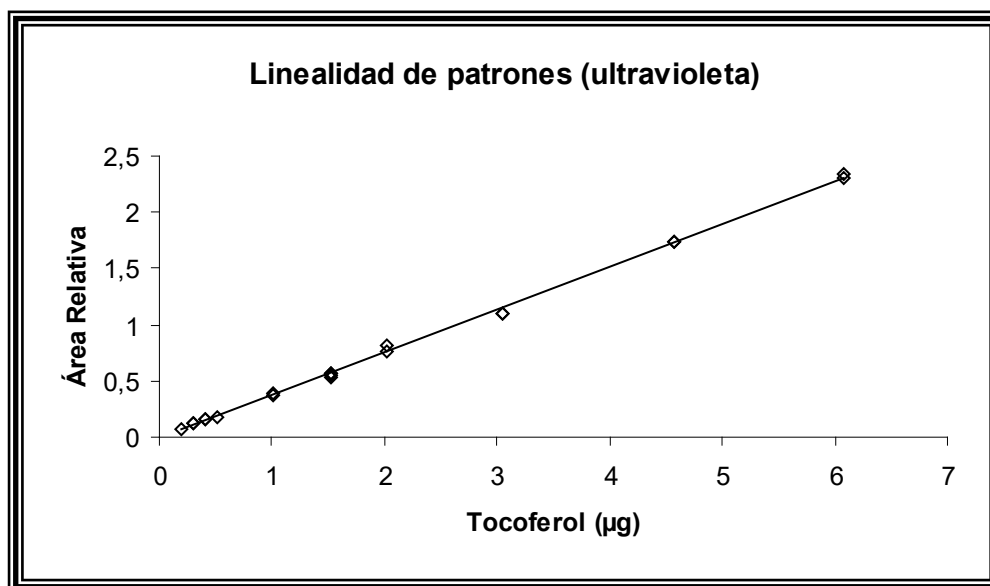
**Cuadro 9:** Principales parámetros de la validación del método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante FD



**Fig. 24:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante FD.

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		2.03 – 6.09	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.00 $\pm$ 0.02	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	0.164 $\pm$ 0.003	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.9994	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		2.52 – 20.2	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	-0.00 $\pm$ 0.09	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	0.0040 $\pm$ 0.0008	Cumple
		r	$\geq 0.990$	0.98	No cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	92	Cumple
		RSD (%)	< 7.3	9	No cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq 6$	6	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		15.9 $\pm$ 0.7	
		RSD (%)	< 7.3	4	Cumple
	Precisión inter-media	n	$\geq 12$	11	No cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		15.9 $\pm$ 0.4	
		RSD (%)	< 2 · RSD <sub>dia1+dia2</sub>	4	Cumple

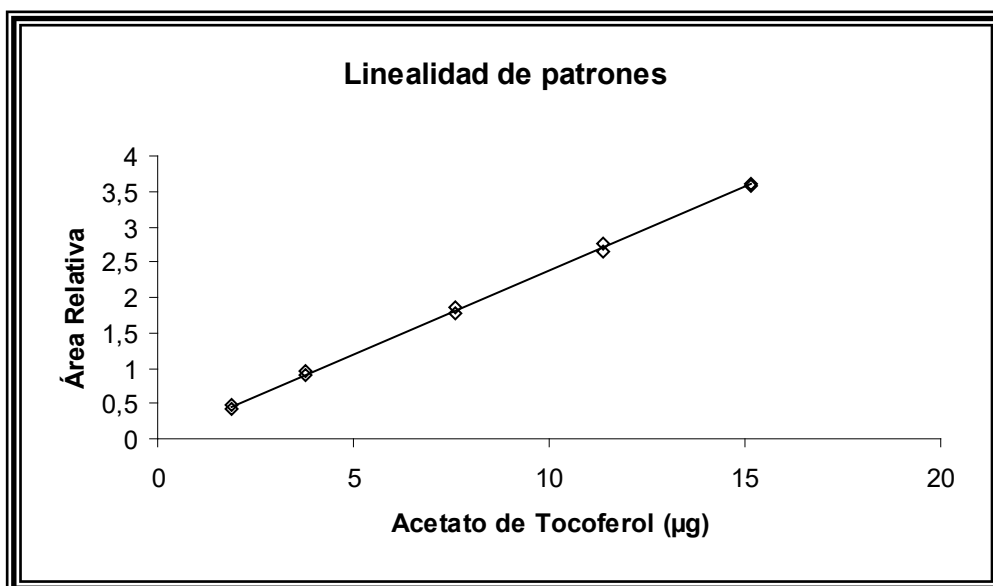
**Cuadro 10:** Principales parámetros de la validación del método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante UVD



**Fig. 25:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en dietas mediante UVD.

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		19.0 - 152	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	$0.01 \pm 0.06$	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	$0.237 \pm 0.006$	Cumple
		r	$\geq 0.9990$	0.9994	Cumple
	Muestras	Rango (mg muestra)		20.2 - 202	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	$-0.15 \pm 0.09$	No cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	$0.0136 \pm 0.0008$	Cumple
		r	$\geq 0.9990$	0.998	No cumple
Exactitud		Recuperación (%)	90 - 107	89	No cumple
		RSD (%)	$< 5.3$	7	No cumple
Precisión	Repetitividad	n	$\geq 6$	6	Cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		$89 \pm 3$	
		RSD (%)	$< 5.3$	2.7	Cumple
	Precisión inter-media	N	$\geq 12$	11	No cumple
		Media ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ I.C.		$90 \pm 3$	
		RSD (%)	$< 2 \cdot \text{RSD}_{\text{día1+día2}}$	4.3	Cumple

**Cuadro 11:** Principales parámetros de la validación del método para cuantificar acetato de  $\alpha$ -tocoferol en dietas



**Fig. 26:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar acetato de  $\alpha$ -tocoferol en dietas.

#### 4.1.4.1 Linealidad

##### 4.1.4.1.1 De $\alpha$ -tocoferol

###### 4.1.4.1.1.1 Fluorescencia

En la Fig. 24 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (fenildodecano), frente a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. El coeficiente de correlación,  $r$ , es superior a 0.99, suficiente para ser aceptado, en función de la concentración de analito en la muestra, alrededor de 0.001% (p/p).

Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (88) es mayor que  $t_{tab}$  (2.086), con una probabilidad del 95%. La media del factor de respuesta ( $1.54 \pm 0.05$ ) es superior a la pendiente de la recta y esto, unido a la alta variabilidad del factor de respuesta (8%), que tiende a disminuir con la concentración de analito, indica que existe una pérdida de linealidad a mayores concentraciones, debido a la saturación de la señal en este detector.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  (1.3) es inferior a  $t_{tab}$  (2.086).

###### 4.1.4.1.1.2 Absorbancia

En la Fig. 25 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (fenildodecano), frente a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, siendo el coeficiente de correlación,  $r$ , superior a 0.999.

Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (136) es mayor que  $t_{tab}$  (2.086), con una probabilidad del 95%. La media del factor de respuesta ( $0.161 \pm 0.004$ ) es prácticamente igual a la pendiente de la recta y la RSD del factor de respuesta (5.5%), sin descartar ningún punto, está muy cerca de estar dentro de los límites oficiales. Al contrario que en fluorescencia, las desviaciones de la linealidad se observan en este caso en los puntos de concentración más baja, en los que la dispersión de la señal es más alta.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  (1.3) es inferior a  $t_{tab}$  (2.086).

##### 4.1.4.1.2 Linealidad de acetato de $\alpha$ -tocoferol

En la Fig. 26 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (fenildodecano), frente a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. El coefi-

coefficiente de correlación,  $r$ , es superior a 0.999 y cumple con lo que se debe esperar de un analito que está en una concentración aproximada de un 10% (p/p).

Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (89) es mayor que  $t_{tab}$  (2.306), la media del factor de respuesta ( $0.239 \pm 0.006$ ) es prácticamente igual a la pendiente de la recta y la RSD del factor de respuesta (3.4%), está dentro de los límites establecidos.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la O.O.  $\pm$  I.C. incluye el 0 y se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  (0.5) es inferior a  $t_{tab}$  (2.306).

#### 4.1.4.2 Linealidad de muestra

##### 4.1.4.2.1 De $\alpha$ -tocoferol

###### 4.1.4.2.1.1 Fluorescencia

El coeficiente de correlación es superior a 0.999 y se podría aceptar incluso siendo sólo superior a 0.99.

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y como  $t_b$  (64) es mucho mayor que 2.571 se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%. El factor de respuesta ( $0.019 \pm 0.002$ ) es semejante a la pendiente de la recta de regresión ( $0.181 \pm 0.007$ ). Sin embargo, su RSD es demasiado elevado, 10%. En la observación de los datos individuales se observa una ligera tendencia a que el factor de respuesta disminuya cuando aumenta la cantidad de muestra, lo que apunta a una posible pérdida de respuesta cuando se trabaja con demasiada muestra.

Test de proporcionalidad: O.O.  $\pm$  I.C. incluyen el 0 y la  $t_a$  (0.6) es menor que  $t_{tab}$ , por lo que se puede rechazar que la recta de regresión de la linealidad de muestra tenga sesgo.

###### 4.1.4.2.1.2 Absorbancia

El coeficiente de correlación no cumple con las especificaciones, pues, aunque está cerca de 0.99, no llega a ese valor.

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y como  $t_b$  (13) es mayor que 2.447 se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%. El factor de respuesta ( $0.0041 \pm 0.002$ ) es semejante a la pendiente de la recta de regresión ( $0.0040 \pm 0.0008$ ). Sin embargo, su RSD es muy elevado, 16%. En la observación de los datos individuales se aprecia una tendencia a que el factor de respuesta disminuya cuando aumenta la cantidad de muestra, lo que de nuevo y como es lógico, apunta a una posible pérdida de respuesta

cuando se trabaja con demasiada muestra, que se acusa más en este detector que en el de fluorescencia.

Test de proporcionalidad: O.O.  $\pm$  I.C. incluyen el 0 y la  $t_a$  (0.1) es menor que  $t_{tab}$ , por lo que se puede rechazar que la recta de regresión de la linealidad de muestra tenga sesgo.

#### 4.1.4.2.2 De acetato de $\alpha$ -tocoferol

El coeficiente de correlación no cumple con las especificaciones, aunque por un pequeño margen, pues, aunque está cerca de 0.999, no llega a ese valor.

Test de linealidad: Pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0 y como  $t_b$  (41) es mayor que 2.447 se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la linealidad con una probabilidad del 95%. El factor de respuesta ( $0.017 \pm 0.003$ ) es mayor que la pendiente de la recta de regresión ( $0.0136 \pm 0.0008$ ) y además su, su RSD es muy elevado, 21%. En la observación de los datos individuales, de nuevo se observa una clara tendencia a que el factor de respuesta disminuya cuando aumenta la cantidad de muestra, por lo que se tiene una nueva evidencia de que la respuesta disminuye cuando aumenta la cantidad de muestra.

Test de proporcionalidad: O.O.  $\pm$  I.C. no incluye el 0 y la  $t_a$  (4.1) es mayor que  $t_{tab}$ , por lo que no se puede rechazar que la recta de regresión de la linealidad de muestra tenga sesgo. Este sesgo está en consonancia con la disminución de señal ya mencionada.

#### 4.1.4.3 Exactitud

##### 4.1.4.3.1 De $\alpha$ -tocoferol

###### 4.1.4.3.1.1 Fluorescencia

La diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (88%) es superior al I.C. de la media (4%), al 95% y la RSD de la recuperación (9%) está por encima del límite máximo admitido por la AOAC (7.3%).

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (68) es muy superior a  $t_{tab}$  (2.110). Sí se puede aceptar además que la pendiente sea 1, pues el valor de  $t_b$  en este caso (0.8) es inferior a 2.306.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. ( $-0.11 \pm 0.05$ ) no incluye el 0 y no se puede aceptar la hipótesis de que  $a = 0$  al 95% ( $4.3 > 2.120$ ), es decir, que la recuperación tiene sesgo. La observación de los valores individuales lleva a la conclusión de que en los niveles bajos de analito la recuperación es más baja.

#### 4.1.4.3.1.2 Absorbancia

La diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (92%) es superior al I.C. de la media (4%), al 95% y la RSD de la recuperación (9%) está por encima del límite máximo admitido por la AOAC (7.3%).

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (67) es muy superior a  $t_{tab}$  (2.120). Se puede aceptar además que la pendiente sea 1, pues el valor de  $t_b$  en este caso (1.6) es inferior a 2.306.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. (-0.054  $\pm$  0.054) no incluye por muy poco el 0, aunque, estrictamente hablando, se puede aceptar la hipótesis de que  $a = 0$  al 95% (2.118 < 2.120). La observación de los valores individuales indica que en los niveles bajos de analito la dispersión de la recuperación es mayor, pero se podría aceptar que no hay sesgo en la recuperación.

#### 4.1.4.3.2 De acetato de $\alpha$ -tocoferol

La diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (89%) es superior al I.C. de la media (4%), al 95% y la RSD de la recuperación (7%) está por encima del límite máximo admitido por la AOAC (2.8%).

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (14) es muy superior a  $t_{tab}$  (2.306). Se puede aceptar que la pendiente sea 1, pues  $t_b$  (1.8) es inferior a 2.306.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. (0  $\pm$  1) incluye el 0 y se puede aceptar la hipótesis de que  $a = 0$  al 95% (0.1 < 2.306), es decir, que la recuperación no tiene sesgo.

#### 4.1.4.4 Precisión

##### 4.1.4.4.1 De $\alpha$ -tocoferol

###### 4.1.4.4.1.1 Fluorescencia

La repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.001\%$ ), pues los coeficientes de variación de ambos días son menores del 5.3%, por lo que cumplen incluso con las especificaciones de la AOAC

El coeficiente de variación de la media conjunta de los días es inferior al doble de la media de los coeficientes de variación obtenidos en cada uno de los días, por lo que se puede aceptar la precisión intermedia del método

###### 4.1.4.4.1.2 Absorbancia

La repetitividad es satisfactoria pues, al igual que en fluorescencia, los coeficientes de variación de ambos días son menores del 5.3%.

También en UV se puede aceptar la precisión intermedia, de nuevo el coeficiente de variación de la media conjunta de los días es inferior al doble de la media de los coeficientes de variación obtenidos en cada uno de los días.

#### 4.1.4.5 De acetato de $\alpha$ -tocoferol

También en este caso la repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.01\%$ ), aunque las especificaciones sean más estrictas, pues los coeficientes de variación de ambos días son menores del 2.8%.

El coeficiente de variación de la media conjunta de los días es inferior al doble de la media de los coeficientes de variación obtenidos en cada uno de los días, por lo que se puede aceptar la precisión intermedia del método.

#### 4.1.4.6 Estabilidad en las dietas

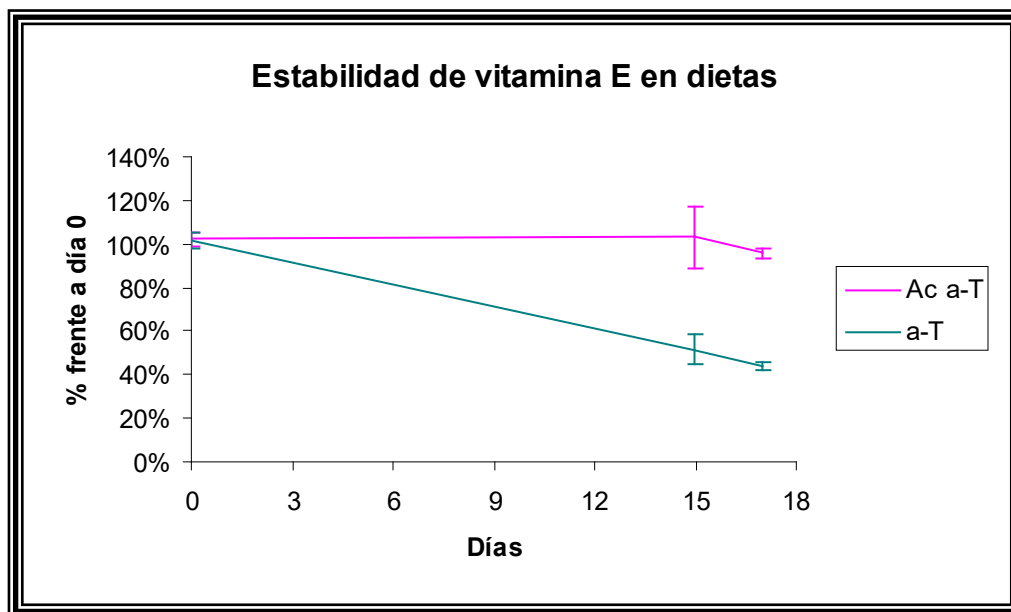
Tras realizar los análisis descritos en el apartado 3.4.3.5.7, se obtuvieron los resultados que se detallan en el Cuadro 12 y en la Fig. 27. Sobre los datos de cada uno de los días se realizó un análisis de la varianza de una vía y las medias de cada uno de los días se compararon mediante el test de Student-Newman-Keuls y se pudo observar que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol disminuye con el almacenamiento y posterior descongelación, hasta valores inferiores a la mitad de los iniciales (Cuadro 12).

	Día 0	Día 15	Día 17
$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ )	$28.9 \pm 0.9^b$	$15 \pm 2^a$	$12.7 \pm 0.5^a$
Acetato de $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ )	$85 \pm 3^a$	$87 \pm 10^a$	$81 \pm 2^a$

**Cuadro 12:** Concentración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol) en dietas preparadas, congeladas y descongeladas tras dos semanas. Los resultados se presentan en forma de media  $\pm$  error estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las medias.

En la Fig. 27 se presentan los resultados en forma porcentual, considerando como 100% el valor medio medido en el día 0. Se puede apreciar que el  $\alpha$ -tocoferol no es estable, pues disminuye en estas condiciones hasta niveles que están por debajo del 50% de los iniciales, mientras que se puede considerar perfectamente estable su forma acetilada. Así pues, el tener protegido el hidroxilo convierte al acetato de  $\alpha$ -tocoferol en una forma estable de vitamina E.





**Fig. 27:** Representación de la estabilidad de  $\alpha$ -tocoferol (a-T) y de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Ac a-T) en dietas congeladas y descongeladas tras dos semanas. En cada uno de los días se representa la media  $\pm$  error estándar. Se considera 100% el valor de la media obtenida en el día 0.

#### 4.1.4.7 Consideraciones finales

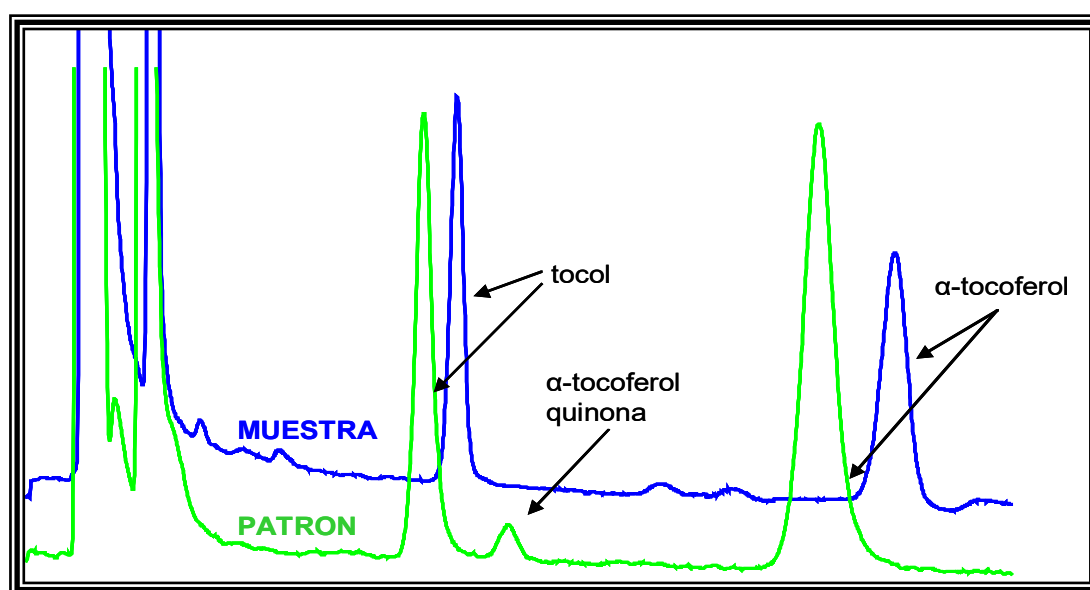
En el caso del análisis de  $\alpha$ -tocoferol, la alta variabilidad de analito en la muestra, debido a las distintas fuentes posibles de aceite, llevó a validar el método en un amplio rango de concentraciones, y, aunque la respuesta al analito es satisfactoria, la presencia de la muestra complica el análisis, pues tanto cuando hay poca muestra como cuando hay poco analito en la muestra, la recuperación parece menor. Las consecuencias prácticas de esto son que hay que trabajar con cantidades de muestra iguales o ligeramente superiores a 100 mg y no intentar aumentar la señal aumentando la cantidad de muestra. El detector de fluorescencia parece tener mejores características para la determinación de  $\alpha$ -tocoferol cuando hay muestras, pero la cuantificación con el detector de UV podría ser suficiente en la mayoría de los casos y el comportamiento de ambos detectores resulta equivalente. Las diferencias en la aceptabilidad de la hipótesis de proporcionalidad de la recuperación en las mismas muestras analizadas por UV o por Fluorescencia se deben a que la mayor dispersión de los datos en los puntos más bajos en el análisis por UV hacen que las hipérbolas de confianza sean relativamente más grandes que cuando se analiza por fluorescencia.

Si bien el contenido en  $\alpha$ -tocoferol de las dietas no se puede considerar el mismo al cabo de los días, pues el almacenamiento le afecta drásticamente, el acetato de  $\alpha$ -tocoferol se mantiene estable, y, puesto que se añade en cantidad suficiente a las dietas, garantiza un aporte cons-

tante y uniforme de vitamina E a los animales durante el tiempo que dura el estudio, independientemente de la dieta. En cualquier caso, resulta conveniente proporcionar dieta recién descongelada a los animales cada día, para minimizar los efectos de la oxidación.

#### 4.1.5 Método para medir $\alpha$ -tocoferol en sangre

En la Fig. 28 se presentan cromatogramas representativos del análisis de patrones y muestras de sangre. Tras obtener los resultados analíticos, se calcularon los parámetros de la validación y los más importantes están resumidos en el Cuadro 13. Se presentan a continuación los comentarios más relevantes acerca de la validación.



**Fig. 28:** Cromatogramas representativos de patrón y muestra de sangre

##### 4.1.5.1 Linealidad de $\alpha$ -tocoferol

En la Fig. 29 se representa la nube de puntos obtenida al representar el área de  $\alpha$ -tocoferol relativa a la de patrón interno (tolcol), frente a la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol. El coeficiente de correlación,  $r$ , es superior a 0.99, suficiente para ser aceptado, en función de la concentración de analito en la muestra, inferior a 0.0001% (p/p).

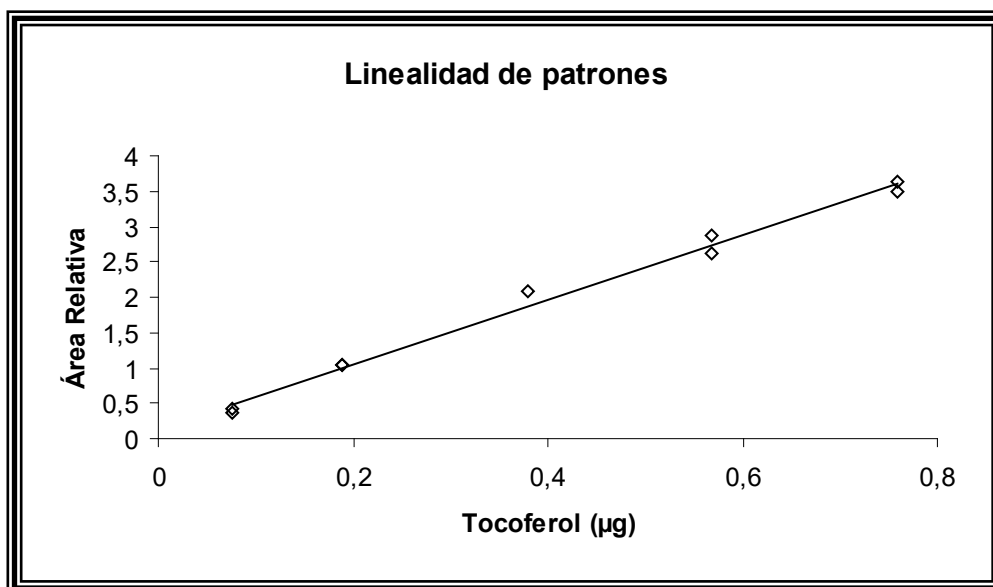
Test de linealidad: La respuesta a la concentración de analito se puede considerar lineal, pues la pendiente  $\pm$  I.C. no incluye el valor 0;  $t_b$  (28) es mayor que  $t_{tab}$  (2.365). La pendiente, sin embargo, es ligeramente inferior al factor de respuesta ( $5.1 \pm 0.3$ ), debido fundamentalmente a que en el punto de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol más baja, la señal es más baja de lo que debiera y

en consecuencia, la RSD del factor de respuesta (8%) es más elevada de lo que debería ser para cumplir con los criterios generales de aceptación.

Test de proporcionalidad: Se puede considerar la respuesta proporcional y sin sesgo, pues la  $O.O. \pm I.C.$  incluye el 0 y además se puede aceptar la hipótesis de que sea 0, pues  $t_a$  (1.7) es inferior a  $t_{tab}$  (2.365).

Propiedad		Parámetro	Especificación	Valor	Aceptación
Linealidad	Patrones	Rango ( $\mu\text{g}$ )		0.08 – 0.8	
		O.O. $\pm$ I.C.	0	$0.1 \pm 0.2$	Cumple
		Pendiente $\pm$ I.C.	$\neq 0$	$4.6 \pm 0.4$	Cumple
		R	$\geq 0.990$	0.996	Cumple
Exactitud		Recuperación (%)	80 - 110	98	Cumple
		RSD (%)	$< 7.3$	7.4	No cumple
Precisión	Repetitividad	N	$\geq 6$	4	No cumple
		Media (mg/dL) $\pm$ I.C.		$337 \pm 14$	
		RSD (%)	$< 7.3$	3	Cumple

**Cuadro 13:** Principales parámetros de la validación del método para medir  $\alpha$ -tocoferol en sangre



**Fig. 29:** Representación de la linealidad de  $\alpha$ -tocoferol en el método para cuantificar  $\alpha$ -tocoferol en sangre

#### 4.1.5.2 *Exactitud de la recuperación de $\alpha$ -tocoferol*

La diferencia entre el valor esperado (100%) y el encontrado (98%) es inferior al I.C. de la media (6%), al 95% y la RSD de la recuperación (7.4%) está sólo una décima por encima del límite máximo admitido por la AOAC (7.3%).

Test de linealidad: La recta de la recuperación tiene una pendiente significativamente distinta de 0, pues  $t_b$  (19) es mayor que  $t_{tab}$  (2.447). A pesar de que se pueda aceptar la hipótesis de la igualdad de la recuperación a 100%, no se puede aceptar que la pendiente de la recuperación sea 1, porque  $t_b$  (4.5) es superior a  $t_{tab}$ , debido a que la recuperación en el punto de mayor concentración es inferior a 100%.

Test de proporcionalidad: La O.O.  $\pm$  I.C. ( $48 \pm 36$ ) no incluye el 0, por lo que no se puede aceptar la hipótesis de que sea 0 al 95% ( $3.309 < 2.306$ ) y por tanto hay sesgo en la recuperación, que está relacionado también con la disminución en la recuperación en el punto más alto.

#### 4.1.5.3 *Precisión*

Debido a las especiales características de esta muestra, se decidió que no se evaluaría la precisión intermedia, pues la sangre no es repetitiva de un día para otro. La repetitividad es satisfactoria para los niveles de analito ensayado ( $\approx 0.0001\%$ ), pues el coeficiente de variación es menor del 3%, por lo que cumple incluso con las especificaciones de la AOAC para niveles de analito muy superiores. Problemas analíticos independientes del tratamiento de muestra hicieron que sólo se pudieran analizar cuatro réplicas, pero dado que los resultados eran muy satisfactorios, no se consideró necesario sacrificar otro animal para completar los resultados.

#### 4.1.5.4 *Consideraciones finales*

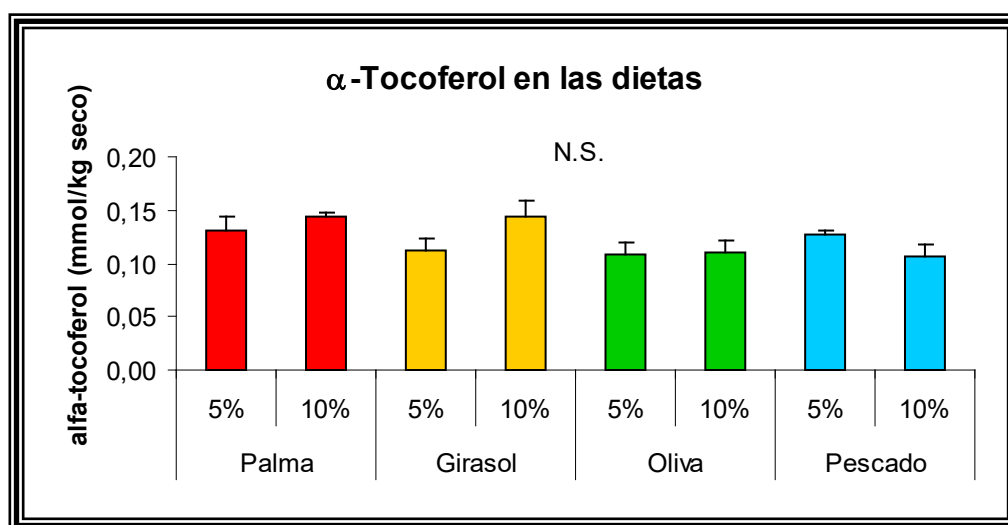
Se puede considerar que los parámetros de validación son satisfactorios para un método con el que se ha conseguido el objetivo propuesto de analizar una muestra de sangre en la menor cantidad posible de tiempo, pues en menos de 10 min desde que se obtenga la sangre puede estar analizándose en el cromatógrafo.

## 4.2 Experimentos con animales

### 4.2.1 Experimento 1: Utilización durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa

#### 4.2.1.1 Dieta

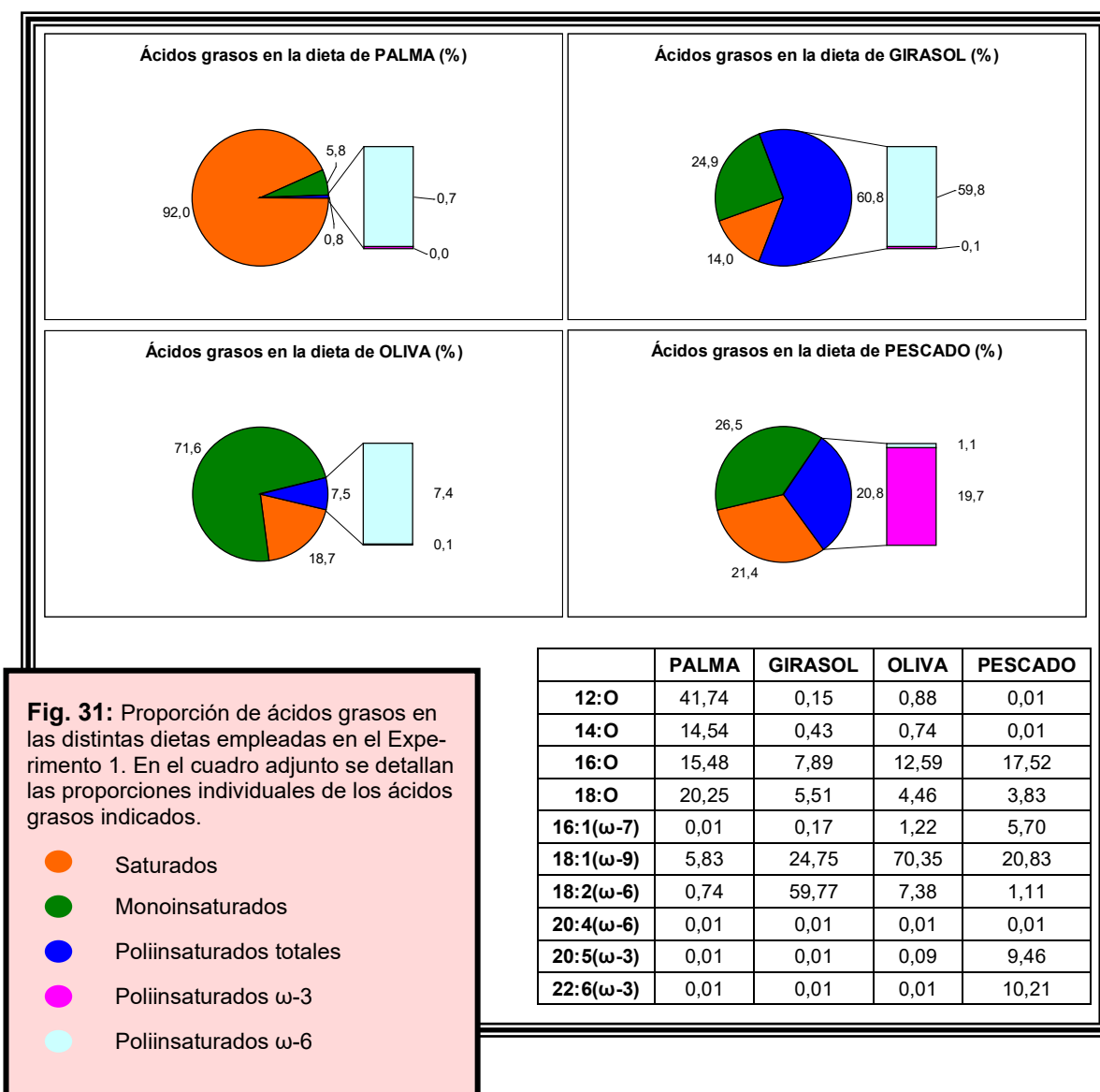
Como se puede observar en la Fig. 30, las dietas utilizadas tenían un contenido similar de vitamina E, debido sobre todo a que a todas se les añadía acetato de  $\alpha$ -tocoferol en la misma proporción. Hay que recordar que el método para cuantificar vitamina E en las dietas no permite conocer la proporción de cada uno de los estereoisómeros de la vitamina E, por lo que no se puede estimar la actividad debida al  $\alpha$ -tocoferol. En el caso del aceite de oliva virgen, se puede suponer que, dado que debe provenir del prensado en frío de la materia prima, todo el  $\alpha$ -tocoferol sea de la forma *RRR*-, pero en el caso del aceite de girasol y de pescado, su procesamiento supone la pérdida de gran parte de la vitamina E que naturalmente poseen, por lo que es habitual añadir  $\alpha$ -tocoferol sintético como antioxidante y no se puede saber cuánto hay de cada una de las posibles formas de vitamina E. En la Fig. 30 se ha optado por representar la vitamina E en forma de moles de  $\alpha$ -tocoferol.



**Fig. 30:** Concentración de vitamina E en las dietas del Experimento 1. Los datos se presentan como media  $\pm$ SEM. N.S.: No significativo.

Las dietas se distinguen fundamentalmente por el distinto contenido en ácidos grasos, como se puede observar en la Fig. 31, aunque esta proporción es independiente del contenido total de grasa en las mismas. Así, la dieta de grasa de palma contiene una proporción más alta de los

ácidos grasos saturados que el resto de las dietas. La dieta de aceite de girasol presenta un contenido de ácido grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -6 (principalmente ácido linoléico,  $C_{18:2\omega-6}$ ) muy superior al resto de las dietas y una proporción de ácidos grasos monoinsaturados (sobre todo ácido oleico,  $C_{18:1\omega-9}$ ) moderada, aunque inferior a la de oliva. Esta dieta presenta mucha mayor proporción de ácido grasos monoinsaturados (oleico casi exclusivamente) que cualquiera de las otras dietas y su contenido en ácido linoléico es inferior al de la dieta de girasol, pero superior a la de cualquiera de las otras dietas estudiadas. La dieta de pescado es la única que presenta cantidades importantes de los ácidos grasos  $\omega$ -3, principalmente el EPA y el DHA y su contenido en monoinsaturados es moderado.



Las ratas recibieron la correspondiente dieta *ad libitum* durante 20 días, que en el caso de las ratas preñadas coincide con los primeros 20 días de gestación. La ingesta media de las ratas a

lo largo del experimento fue estimada y analizada previamente [562] y en la presente Memoria se comentan los datos correspondientes. Como se muestra en el Cuadro 14, la ingesta media diaria durante la última semana de tratamiento y gestación dentro de un mismo porcentaje de grasa es similar en todos los grupos. Al comparar la ingesta de ratas vírgenes frente a las preñadas, dentro de un mismo porcentaje de dieta, se observa la conocida hiperfagia gestacional.

De una forma global, se puede apreciar una disminución importante en la ingesta cuando las ratas toman la dieta con un 10% de grasa con relación a la del 5%, pero la ingesta energética es similar entre ratas vírgenes, independientemente del porcentaje de grasa y lo mismo ocurre con las ratas preñadas. En cuanto a la ingesta absoluta de grasa, se observa que las ratas que toman la dieta con un 10% de grasa realmente no ingieren el doble de grasa que las del 5%, sino sólo alrededor de un 60% más. A su vez, es interesante hacer notar que la ingesta calórica de los animales resultó ser más baja en las ratas que recibían dieta con un 10% de grasa que las que ingerían la dieta con un 5% de grasa (Cuadro 15)

			DIETAS			
			Palma	Girasol	Oliva	Pescado
5%	VÍRGENES	g/rata/día	24.3±0.4	21.2±4.4	22.7±1.2	22.3±1.5
		kcal/rata/día	92.3±2.7	76.5±15.7	85.9±4.8	83.4±6.3
		g grasa/rata/día	1.2±0.0	1.1±0.2	1.1±0.1	1.1±0.1
	PREÑADAS	g/rata/día	30.4±0.4	29.2±0.8	31.5±1.6	32.1±1.4
		kcal/rata/día	110.6±1.4	106.7±3.1	115.2±5.8	115.7±5.9
		g grasa/rata/día	1.5±0.0	1.5±0.0	1.6±0.1	1.6±0.1
10%	VÍRGENES	g/rata/día	19.4±0.3	18.2±0.2	18.5±0.6	18.3±0.5
		kcal/rata/día	75.7±1.2	70.1±0.8	72.2±2.3	71.4±1.9
		g grasa/rata/día	1.9±0.0	1.8±0.0	1.9±0.1	1.8±0.1
	PREÑADAS	g/rata/día	24.9±0.5	24.5±1.6	23.8±0.8	24.3±1.2
		kcal/rata/día	97.1±1.9	95.6±6.2	92.8±3.1	94.8±4.7
		g grasa/rata/día	2.5±0.1	2.5±0.2	2.4±0.2	2.4±0.1

**Cuadro 14:** Ingesta media durante la última semana de experimento de las ratas alimentadas con distintas dietas. Los resultados se muestran como media±SEM. Datos tomados de la tesis doctoral de la Dra. E. Amusquivar [562]

### 4.2.1.2 Parámetros corporales

En el Cuadro 15 se puede observar que el peso corporal final (al día 20 de gestación) no se modificó en las ratas vírgenes ni en las preñadas con ninguna de las cuatro dietas estudiadas, independientemente de la cantidad de grasa que tuvieran. Sin embargo y como era de esperar, el peso corporal era siempre más alto en las ratas preñadas que en las vírgenes y esta diferencia se observa tanto en el peso total como en el peso neto, estimado restando el peso del *conceptus*.

GRUPO	Peso total día 20 (g)	Peso neto	Peso hígado (g)	Peso TAL (g)	Peso <i>conceptus</i> (g)	Peso placenta (g)	Nº de fetos	Peso fetal (g)	Peso hígado fetal (g)
P5-V	231.7±3.8		9.41±0.26	1.04±0.16 <sub>a</sub>					
G5-V	261.3±13.9		9.31±0.45	1.29±0.13 <sub>a</sub>					
O5-V	248.8±3.9		9.47±0.23	1.05±0.11 <sub>a</sub>					
PE5-V	235.8±10.3		9.41±0.26	0.58±0.07 <sub>a</sub>					
P5-G	345.4±10.4 ***	266.5±6.0	12.06±0.33 ***	1.54±0.11 AB*	78.9±4.3	0.54±0.03	14.6±0.8	3.65±0.06	0.23±0.01
G5-G	364.7±10.5 ***	291.0±8.3	12.27±0.68 **	1.92±0.27 AB*	73.7±2.0	0.59±0.04	13.3±0.7	3.89±0.18	0.26±0.02
O5-G	339.6±12.6 ***	270.7±10.4	11.85±0.74 **	1.79±0.18 AB	68.9±2.2	0.55±0.04	12.8±1.2	4.00±0.26	0.27±0.01
PE5-G	337.8±9.2 ***	251.5±6.5	11.76±0.46 *	1.26±0.17 A*	86.3±3.1	0.58±0.03	15.0±0.8	3.61±0.08	0.24±0.01
P10-V	247.9±6.3		9.27±0.09	1.24±0.14 <sub>a</sub>					
G10-V	283.3±14.5		10.87±1.02	3.52±0.42 <sub>b</sub>					
O10-V	258.1±1.5		9.87±0.34	1.69±0.19 <sub>a</sub>					
PE10-V	255.5±5.6		11.14±0.33	1.16±0.10 <sub>a</sub>					
P10-G	369.5±12.1 ***	286.8±7.5	14.92±0.95 ***	2.27±0.15 AB***	82.7±5.7	0.46±0.05	13.8±1.2	3.97±0.14	0.26±0.01
G10-G	376.7±15.0 ***	294.4±10.4	12.64±0.81	2.19±0.45 B	82.3±5.2	0.50±0.01	13.5±0.3	3.61±0.14	0.24±0.02
O10-G	358.3±8.3 ***	277.1±5.5	13.93±0.72 ***	2.64±0.18 AB	81.2±2.5	0.49±0.02	14.2±0.2	3.71±0.15	0.26±0.02
PE10-G	332.5±14.3 ***	256.6±10.1	13.49±0.82 *	1.43±0.18 A	75.9±5.7	0.52±0.03	12.0±1.0	3.78±0.14	0.27±0.02

**Cuadro 15:** Parámetros corporales de las ratas estudiadas a día 20 de gestación y tratamiento o día 20 de tratamiento. Los datos se presentan como media±SEM. Datos tomados de la tesis doctoral de la Dra. E. Amusquivar [562]

Cuando hay diferencias estadísticamente significativas, la homogeneidad de medias se indica mediante letras: Letras minúsculas distintas indican diferencias entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

Para la identificación de los grupos, se ha seguido siempre el mismo criterio: primero unas letras para indicar el tipo de dieta (P-Palma; G-Girasol; O-Oliva; PE-Pescado), con un número para indicar el porcentaje de grasa y luego una letra para indicar la condición de los animales (V-vírgenes, G-gestantes)



Las distintas dietas tampoco modificaron el peso del hígado en ratas vírgenes ni en preñadas, aunque se observa el aumento sistemático del tamaño del hígado debido a la gestación. Asimismo, se puede observar una tendencia a que las ratas alimentadas con las dietas que contienen el 10% de grasa presenten un mayor peso del hígado que las alimentadas con un 5% de grasa.

Se puede observar también un menor peso del tejido adiposo lumbar en las ratas alimentadas con la dieta de aceite de pescado, tanto con un 5% como con un 10%, frente a los otros grupos y esta disminución es aún mayor en el caso de las preñadas.

Además se observa que, como cabía esperar, existe una tendencia a un mayor peso del tejido adiposo lumbar en las preñadas comparándolas con las vírgenes alimentadas con dietas basadas en el mismo tipo de grasa. Por otro lado, se observa también un mayor peso del tejido adiposo lumbar en las ratas alimentadas con dieta con 10% de grasa con relación a las del 5%.

Ni el peso del *conceptus*, de los fetos, del hígado fetal o de las placentas, ni el número de fetos se modificaron con la ingesta materna de cualquiera de las cuatro dietas y el distinto porcentaje de grasa en estas dietas tampoco modificó estos parámetros.

#### 4.2.1.3 $\alpha$ -Tocoferol tisular

Para analizar los resultados tanto en plasma como en hígado o tejido adiposo se asumió la homogeneidad de varianzas y se realizaron sendos ANOVAS de tres vías, basados en modelos de tres niveles de interacción y se obtuvieron los correspondientes p-valores asociados a las probabilidades de significatividad de cada factor e interacción. Tras el ANOVA, se realizaron sendos tests de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (con un nivel de confianza del 95%) para cada uno de los tres factores ensayados (Dieta = tipo de grasa en la dieta - palma, girasol, oliva o pescado-; gestación = vírgenes o preñadas; porcentaje = porcentaje de grasa en la dieta - 5% ó 10%-).

Para poder interpretar de una forma más visual los resultados se realizaron, para cada tejido, dos ANOVAS de una vía, uno para analizar las diferencias entre los grupos de ratas vírgenes y otro para las preñadas, independientemente de la cantidad de grasa que tomaban en la dieta. Tras estos ANOVAS se evaluaron las diferencias entre las medias de cada grupo mediante el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (al 95%) y los resultados se expresan en cada caso en las respectivas figuras mediante letras que indican la homogeneidad de las medias. Se hicieron también comparaciones basadas en la *t* de Student, entre cada pareja de medias (vírgenes y preñadas) correspondientes a la misma dieta y cantidad de grasa y cuando la diferencia resultó significativa se indica en las figuras mediante asteriscos.

En el caso de los resultados en placenta e hígado fetal, tras un ANOVA de dos vías basado en un modelo de dos niveles de interacción, se obtuvieron los correspondientes p-valores asociados a las probabilidades de significatividad de cada factor e interacción. Tras estos ANOVAS se realizaron sendos tests de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (con un nivel de confianza del 95%) para cada uno de los dos factores ensayados (dieta y porcentaje). Se han realizado también ANOVAS de una vía, para posteriormente analizar las diferencias entre las medias mediante el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls, al 95% y los resultados se expresan en cada caso en las respectivas figuras mediante letras que indican la homogeneidad de las medias.

### 4.2.1.3.1 $\alpha$ -Tocoferol en plasma

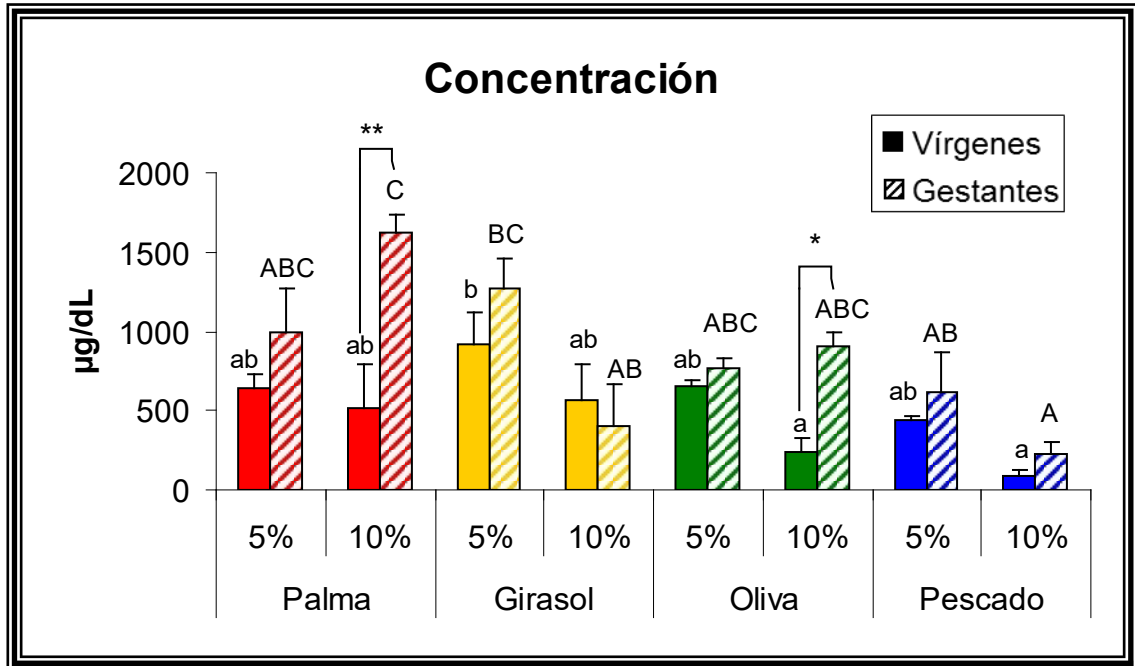
#### 4.2.1.3.1.1 *Concentración de $\alpha$ -tocoferol en plasma*

Los resultados obtenidos para cada uno de los 16 grupos experimentales se representan en la Fig. 32 y en los Cuadros 16 y 17 se resumen los principales parámetros obtenidos al realizar el análisis estadístico de los datos.

*Tipo de dieta:* Como se resume en el Cuadro 16, existe una fuerte evidencia estadística de que el tipo de dieta influye sobre la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol. Al analizar las medias de  $\alpha$ -tocoferol plasmático correspondientes a cada dieta (Cuadro 17), se encuentra que las ratas alimentadas con aceite de pescado tienen menos  $\alpha$ -tocoferol en el plasma.

*Gestación:* La gestación también tiene una influencia significativa en el modelo estadístico que relaciona la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol con los distintos factores ensayados, como se ve en el Cuadro 16 y así las ratas preñadas tienen niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol más altos que las vírgenes, como se indica en el Cuadro 17.

*Porcentaje de grasa:* El que las ratas tomen las dietas con un 5 o un 10% de grasa influye significativamente sobre los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma (Cuadro 16) y en el Cuadro 17 se aprecia globalmente que, con excepción de las ratas que tomaron la dieta de grasa de palma, las ratas que ingieren las dietas con un 10% de grasa tienen menos  $\alpha$ -tocoferol en plasma que las que tomaron las dietas con un 5% de grasa. Este efecto del incremento de grasa en la dieta reduciendo los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma se observa claramente en los animales que ingieren aceite de girasol o de pescado y tanto en las ratas vírgenes como en las preñadas.



**Fig. 32:** α-Tocoferol en plasma de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.0002
Gestación	0.0006
Porcentaje	0.02
INTERACCIONES	
Dieta-Gestación	0.08
Dieta-Porcentaje	0.02
Gestación-Porcentaje	0.3
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.07

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	Vírgenes	X	10%	X
Oliva	X	Preñadas	X	5%	X
Girasol	X				
Palma	X				

**Cuadro 17:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre los niveles de α-tocoferol en plasma.

**Cuadro 16:** Comparación de las medias de α-tocoferol en plasma en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las espas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.

*Interacciones de la gestación con el porcentaje de grasa y el tipo de dieta:* En el modelo escogido para analizar los datos de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, la interacción del factor “porcentaje” con el factor “gestación” (Cuadro 16) no es significativa, lo que significa que ambos factores ejercen su influencia sobre los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de forma independiente y no existe ninguna sinergia (o inhibición) entre ambos factores. La gestación ejerce su influencia también independientemente del tipo de grasa de la dieta, pues, como se aprecia en el Cuadro 16, la interacción gestación-tipo de grasa tampoco es significativa (con un 95% de confianza).

*Interacción del porcentaje de grasa y el tipo de dieta:* Sin embargo, la interacción del tipo de grasa de la dieta con el porcentaje de grasa sí es significativa (Cuadro 16). Para ayudar a explicar esta interacción se pueden agrupar los valores de concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol correspondientes a cada dieta según el porcentaje de grasa, independientemente del estado gestacional, es decir, todos los valores de concentración de  $\alpha$ -tocoferol plasmático de las ratas alimentadas con dietas con un 5% de grasa por un lado y todas las de dietas con un 10% por otro. Una vez agrupados, se puede evaluar el valor del cociente entre los valores del 5% y del 10% de cada una de las dietas. De esta forma se observa que la variación en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol asociada a un mayor porcentaje de grasa en la dieta es distinta según el tipo de grasa, pues la concentración de  $\alpha$ -tocoferol de las ratas P5 es 0.6 veces la de las ratas P10, en las ratas O5 la concentración es 1.3 veces la de las ratas de O10, los niveles de  $\alpha$ -tocoferol de las ratas G5 son 2.3 veces los de las G10 y los de PE5 son casi 3 veces los de PE10. Esto indica que la disminución de la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol que se observa cuando el porcentaje de grasa de la dieta es mayor, es más acusada cuando las dietas son más ricas en ácidos grasos poliinsaturados.

#### **4.2.1.3.1.2 Relación de $\alpha$ -tocoferol frente a lípidos totales en plasma**

Para estudiar si las variaciones de  $\alpha$ -tocoferol son dependientes o no del metabolismo lipídico, es habitual expresar la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol corregida por la concentración de lípidos (triglicéridos y colesterol). En la Fig. 33 se presentan los resultados obtenidos al realizar estos cálculos. La estadística aplicada es la misma que en el caso anterior y se resume en los Cuadros 18 y 19.

*Tipo de dieta:* Como se muestra en el Cuadro 18, existe una evidencia significativa de que el tipo de grasa de la dieta modifica el cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos, que, como se puede ver en el Cuadro 19, es más bajo en las ratas que tomaron las dietas de oliva y de pescado. La dieta de aceite de girasol, con más  $\alpha$ -tocoferol, eleva esta relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos.

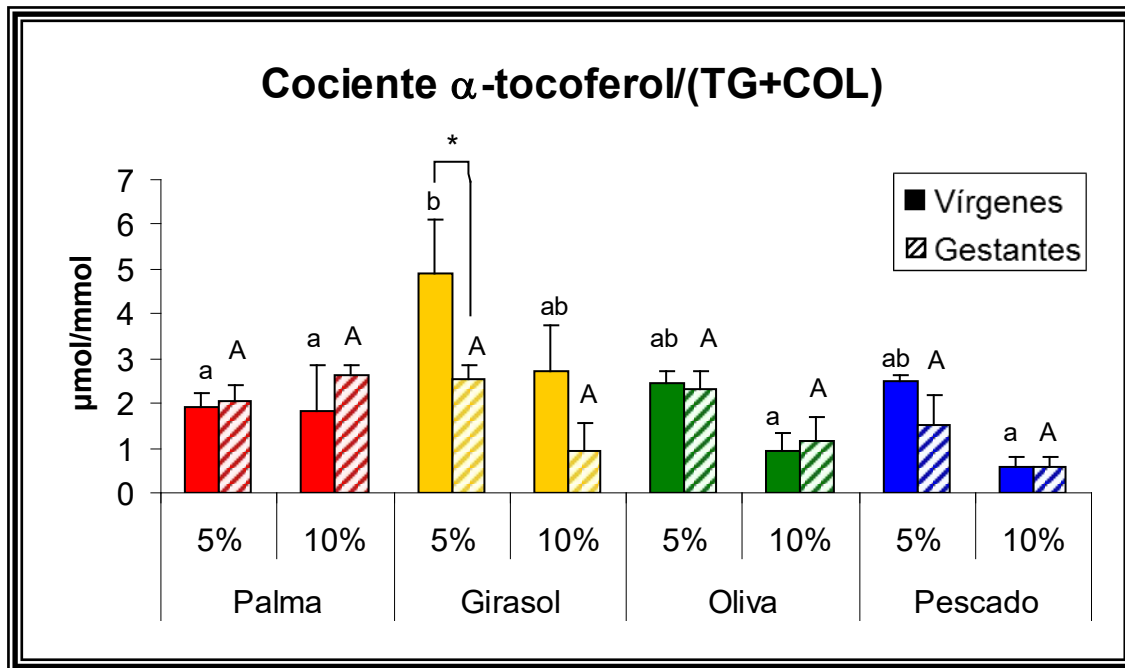
*Porcentaje de grasa:* El porcentaje de grasa en la dieta también altera la proporción de  $\alpha$ -tocoferol frente a lípidos, porque en el Cuadro 18 se puede ver que el p-valor asociado a la hi-

pótesis de que el factor “porcentaje” influya es inferior a 0.05. La tendencia es la misma que se observaba al estudiar la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol, es decir, que las ratas que toman una dieta con un 5% de grasa tienen valores más altos que los de las que toman dietas con un 10%, en este caso del cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos. Aunque ésta es la tendencia global, en el caso de los valores de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos en plasma de las ratas alimentadas con la dieta de grasa de palma no se aprecia que cuando la dieta tiene un 10% de grasa la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos sea menor que cuando la dieta tiene un 5% de grasa.

*Gestación:* En términos globales, la gestación no modifica significativamente este cociente entre el  $\alpha$ -tocoferol y el conjunto de lípidos, como se aprecia en el Cuadro 18. En consecuencia, la media agrupada de todos los valores correspondientes a las ratas vírgenes es homogénea con la de todos los de ratas preñadas (Cuadro 19). A pesar de esta tendencia global, se puede observar que en el caso de la dieta con un 5% de aceite de girasol sí hay evidencia estadística de un mayor valor de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos en el plasma de las ratas vírgenes frente a las correspondientes preñadas (Fig. 33).

*Interacción del tipo de dieta con la gestación o con el porcentaje de grasa:* La interacción del factor “dieta” con cualquiera de los otros dos resulta significativa, como se indica en el Cuadro 18. Por una parte, los valores de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales de los grupos de palma no siguen la tendencia global observada en los otros grupos, en los que se aprecia que esta relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos en plasma es menor cuando el porcentaje de grasa en la dieta es mayor y así, el que exista una dieta en la que no se cumple esta tendencia supone que la interacción del factor “dieta” con el factor “porcentaje” sea estadísticamente significativa. A su vez, la dieta de aceite de girasol altera la tendencia global de la falta de influencia de la gestación sobre los valores de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos en plasma y se puede observar (Cuadro 18) que sólo en estos grupos de ratas alimentadas con la dieta de aceite de girasol los valores de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos en plasma correspondientes a los grupos de ratas preñadas son inferiores a los de sus correspondientes controles, por lo que la interacción del factor “dieta” con el factor “gestación” resulta estadísticamente significativa.

*Interacción de la gestación y el porcentaje de grasa:* De nuevo, como ocurría en los valores de concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol (Cuadro 16), no hay evidencia de interacción entre la gestación y el porcentaje de grasa de la dieta sobre la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos (Cuadro 18) y cada uno de estos factores ejerce su influencia por separado.



**Fig. 33:** Cociente de  $\alpha$ -tocoferol entre lípidos (triglicéridos y colesterol) en plasma de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media $\pm$ SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*,  $p < 0.05$

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Porcentaje	0.0003
Dieta	0.002
Gestación	0.2
INTERACCIONES	
Dieta-Porcentaje	0.05
Gestación-Porcentaje	0.3
Dieta-Gestación	0.02
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.996

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	Vírgenes	X	10%	X
Oliva	X	Preñadas	X	5%	X
Palma	X X				
Girasol	X				

**Cuadro 19:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre los niveles de  $\alpha$ -tocoferol corregidos por lípidos totales en plasma.

**Cuadro 18:** Comparación de las medias del cociente  $\alpha$ -tocoferol/(TG+COL) en plasma en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las espas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.

### 4.2.1.3.2 $\alpha$ -Tocoferol en hígado

#### 4.2.1.3.2.1 Concentración de $\alpha$ -tocoferol

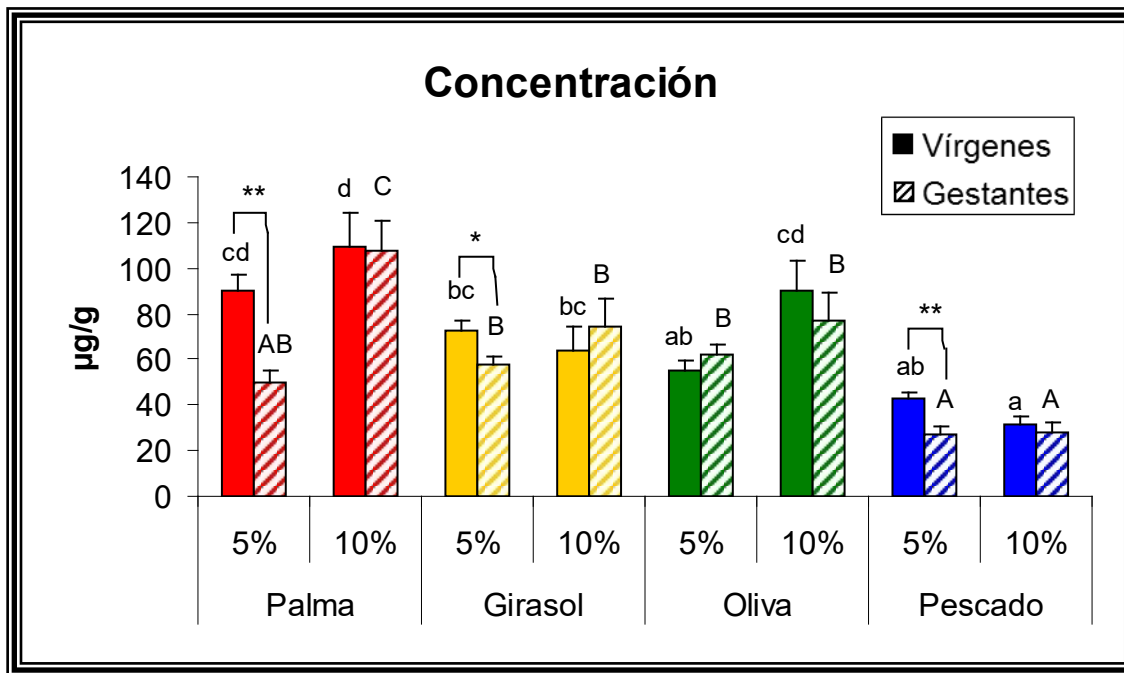
Los resultados obtenidos para la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de cada uno de los 16 grupos experimentales se representan en la Fig. 34 y en los Cuadros 20 y 21 se resumen los principales parámetros estadísticos obtenidos.

*Tipo de dieta:* El tipo de grasa de la dieta de nuevo ejerce una influencia muy significativa, en este caso sobre la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado, como se indica en el Cuadro 20. En términos generales, se puede afirmar que las ratas que toman la dieta con grasa de palma presentan una mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol que las de las dietas de girasol y oliva y éstas a su vez tienen una mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol que las de pescado, como se observa en el Cuadro 21.

*Porcentaje de grasa:* El porcentaje de grasa en la dieta modifica la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado (Cuadro 20), pero de manera inversa a como lo hacía en plasma; es decir, que las ratas que toman las dietas con un 10% de grasa tienen una mayor concentración hepática de  $\alpha$ -tocoferol (Cuadro 21).

*Gestación:* Existe también una evidencia significativa de que la gestación disminuye la concentración hepática de  $\alpha$ -tocoferol, pues el p-valor asociado a la influencia del factor "gestación", indicado en el Cuadro 20, es inferior a 0.05 y la media agrupada de todos los valores de concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas vírgenes no es homogénea con la correspondiente media agrupada de las preñadas, como se expresa en el Cuadro 21.

*Interacción del porcentaje de grasa y el tipo de dieta:* Sólo existe evidencia de una interacción, la que presentan el tipo de dieta y el porcentaje de grasa en la dieta, como se observa en el Cuadro 20. En relación con esta interacción, el grado de saturación de la grasa de la dieta parece estar relacionado con el aumento de concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado que se observa en los grupos alimentados con dietas con un 10% de grasa frente a los del 5%. En consecuencia, además de aumentar la concentración cuanto más saturada sea la grasa de la dieta, en las ratas alimentadas con dietas con un 10% de grasa la concentración hepática de  $\alpha$ -tocoferol es tanto mayor cuanto más saturada sea la dieta y así, la concentración media de las ratas PE10 es 0.9 veces la de las ratas PE5, la de las ratas G10 es 1.1 veces la de las ratas G5, la de las ratas O10 es 1.4 veces la de O5 y la de las P10 es 1.5 veces la de las P5. Es decir, que, como ocurría con la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 32), cuanto más pool insaturada es la dieta, menor es el incremento asociado al mayor porcentaje de grasa en la dieta que se observa en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado.



**Fig. 34:** Concentración de α-tocoferol en hígado de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.0000
Gestación	0.04
Porcentaje	0.0002
INTERACCIONES	
Dieta-Gestación	0.3
Dieta-Porcentaje	0.001
Gestación-Porcentaje	0.09
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.08

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	Preñadas	X	5%	X
Girasol	X	Vírgenes	X	10%	X
Oliva	X				
Palma	X				

**Cuadro 21:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de α-tocoferol en hígado.

**Cuadro 20:** Comparación de las medias de la concentración de α-tocoferol en hígado en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las aspas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.



*Interacciones de la gestación con el tipo de dieta y el porcentaje de grasa:* La gestación ejerce su influencia independientemente de los otros dos factores, aunque en el caso de la interacción con el porcentaje de grasa está cerca de ser significativa, como se indica en el Cuadro 20. El que la gestación tienda a disminuir la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado y que tomar las dietas con un 10% de grasa tienda a aumentarla es lo que lleva a que las diferencias entre grupos de vírgenes y preñadas de las dietas de palma, girasol y pescado sean significativas cuando la dieta tiene un 5% de grasa y no lo sean cuando la dieta tiene un 10%, aunque en el caso de la dieta de aceite de oliva no son significativas en ninguno de los dos casos, como se puede apreciar en la Fig. 34.

#### 4.2.1.3.2.2 Cantidad de $\alpha$ -tocoferol

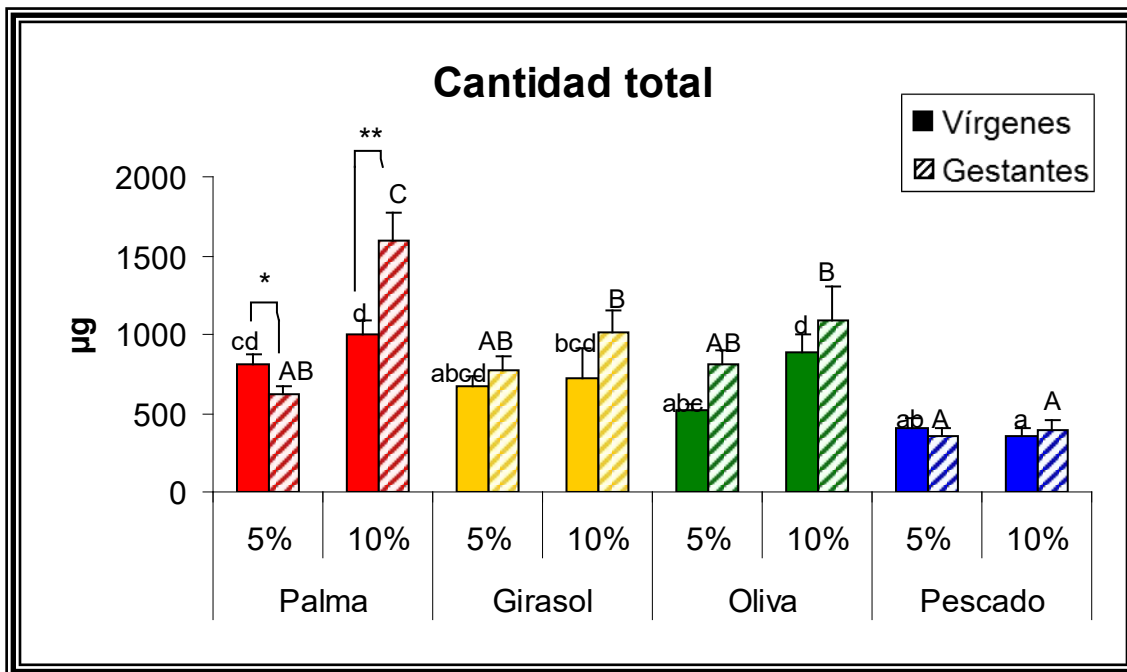
Dado que, como se ha presentado en el Cuadro 15, el porcentaje de grasa y la gestación modifican el peso del hígado, se calculó también la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol por hígado, multiplicando la concentración por el peso correspondiente. Los resultados se presentan en la Fig. 35 y en los Cuadros 22 y 23.

*Tipo de dieta:* Como era de esperar, los resultados de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en hígado según la dieta siguen el mismo patrón que la concentración: la dieta de aceite de pescado produce una disminución en la cantidad total frente a oliva y girasol y las cantidades en estos grupos son a su vez menores que en los grupos de grasa de palma.

*Gestación:* Se observa en estos datos (Cuadro 22) que en la gestación varía esta cantidad acumulada, pero en distinto sentido que la concentración, pues aunque disminuya la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado (Cuadros 20 y 21), aumenta la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol presente en este órgano, aunque en las comparaciones dos a dos entre vírgenes y preñadas (Fig. 35), sólo en las de los grupos a dieta con un 10% de grasa de palma el aumento es significativo y en el caso de las ratas que tomaron las dietas con un 5% de grasa de palma son las ratas preñadas las que presentan una menor cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en hígado.

*Porcentaje de grasa:* Dado que, como ya se ha presentado, el tamaño del hígado aumenta en las ratas que toman las dietas con un 10% de grasa (Cuadro 15) y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado también aumenta en estos animales (Cuadros 20 y 21), es lógico que también la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol presente en el hígado aumente cuando la dieta tiene un 10% de grasa y esto se refleja en los Cuadros 22 y 23.

*Interacción de la gestación y el tipo de dieta:* De nuevo, como ocurría con la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma (Cuadro 16) y en hígado (Cuadro 20), se observa en el Cuadro 22 que la gestación modifica (en este caso aumentando) de manera independiente del tipo de grasa de la dieta, pues la interacción no es significativa.



**Fig. 35:** Cantidad total de α-tocoferol en hígado de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.0000
Gestación	0.003
Porcentaje	0.0000
INTERACCIONES	
Dieta-Gestación	0.3
Dieta-Porcentaje	0.001
Gestación-Porcentaje	0.02
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.02

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	Vírgenes	X	5%	X
Girasol	X	Preñadas	X	10%	X
Oliva	X				
Palma	X				

**Cuadro 23:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la cantidad de α-tocoferol en hígado.

**Cuadro 22:** Comparación de las medias de la cantidad de α-tocoferol en hígado en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las espas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.

*Interacción de la gestación y el porcentaje de grasa:* En este caso la interacción de la gestación con el porcentaje de grasa de la dieta sí es significativa, como se indica en el Cuadro 22, mientras que la interacción de estos mismos factores no era significativa ni para la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma (Cuadro 16), ni para la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos (Cuadro 18), ni para la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado (Cuadro 20).

*Interacción del porcentaje de grasa y el tipo de dieta:* El tipo de grasa y el porcentaje de grasa de la dieta también interaccionan de manera significativa sobre la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol (Cuadro 22), como era de esperar, pues la influencia conjunta de estos dos factores sobre la concentración hepática (Cuadro 20) también era mayor de lo correspondiente a la suma de las respectivas influencias individuales.

Cabe finalmente enfatizar la menor concentración (y cantidad) de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de las ratas que ingieren dieta de aceite de pescado. Este resultado concuerda también con la menor concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en estos animales, la cual es especialmente manifiesta en aquéllos que ingieren dietas con el 10% de grasa (Figs. 32 y 33).

### **4.2.1.3.3 $\alpha$ -Tocoferol en tejido adiposo lumbar**

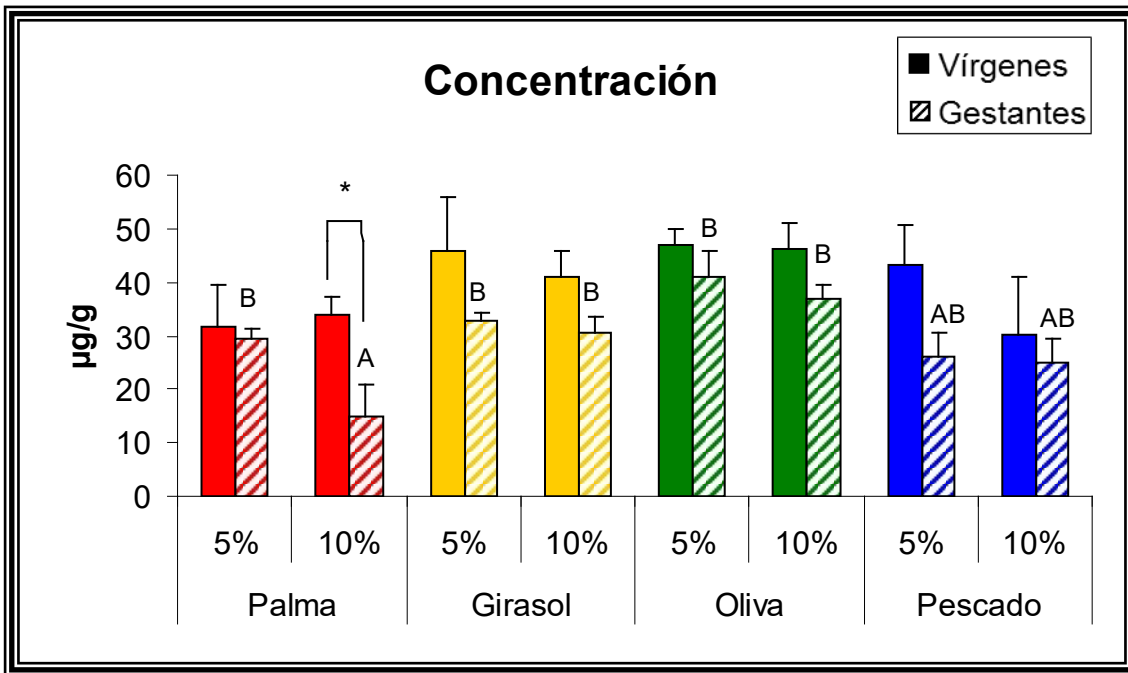
#### *4.2.1.3.3.1 Concentración de $\alpha$ -tocoferol*

Los resultados obtenidos para cada uno de los 16 grupos experimentales se representan en la Fig. 36 y en los Cuadros 24 y 25.

Como se aprecia en la Fig. 36, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar varía muy poco con el tipo de dieta o con el porcentaje de grasa de la dieta, de tal forma que las medias de todos los grupos de ratas vírgenes son homogéneas, y, en el caso de las preñadas, tan sólo un grupo (P10G) tiene valores no homogéneos (más bajos) con relación a los otros siete.

*Tipo de dieta:* Pero, aunque las diferencias son pequeñas, hay evidencia suficiente para afirmar que la respuesta al tipo de dieta es distinta (Cuadro 24) y que en las ratas alimentadas con grasa de palma y pescado la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo es menor que con aceite de oliva, mientras que la dieta de aceite de girasol produce una concentración mayor que con la grasa de palma, pero que no se puede afirmar que sea distinta de la concentración observada con el aceite de pescado o con el de oliva (Cuadro 25).

*Porcentaje de grasa:* No hay evidencia de que el porcentaje de grasa en la dieta modifique la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo, pues el p-valor asociado a este factor es superior a 0.05 (Cuadro 24).



**Fig. 36:** Concentración de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Letras minúsculas distintas indicarían diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, p<0.05

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.002
Gestación	0.0004
Porcentaje	0.09
INTERACCIONES	
Dieta-Gestación	0.9
Dieta-Porcentaje	0.9
Gestación-Porcentaje	0.8
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.3

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Palma	X	Preñadas Vírgenes	X	10%	X
Pescado	X X		X	5%	X
Girasol	X X				
Oliva	X				

**Cuadro 25:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar.

**Cuadro 24:** Comparación de las medias de la concentración de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las espas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.

*Gestación:* En el caso de la gestación, aunque sólo una comparación entre vírgenes y preñadas que tomaran la misma dieta fuera significativa (P10V frente a P10G), se puede afirmar globalmente que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo disminuye con la gestación (Cuadros 24 y 25).

*Interacciones:* Estas influencias del tipo de grasa y la gestación deben ser completamente independientes, pues se puede observar en el Cuadro 24 que ninguna de las interacciones entre los factores es significativa.

#### 4.2.1.3.3.2 Cantidad de $\alpha$ -tocoferol

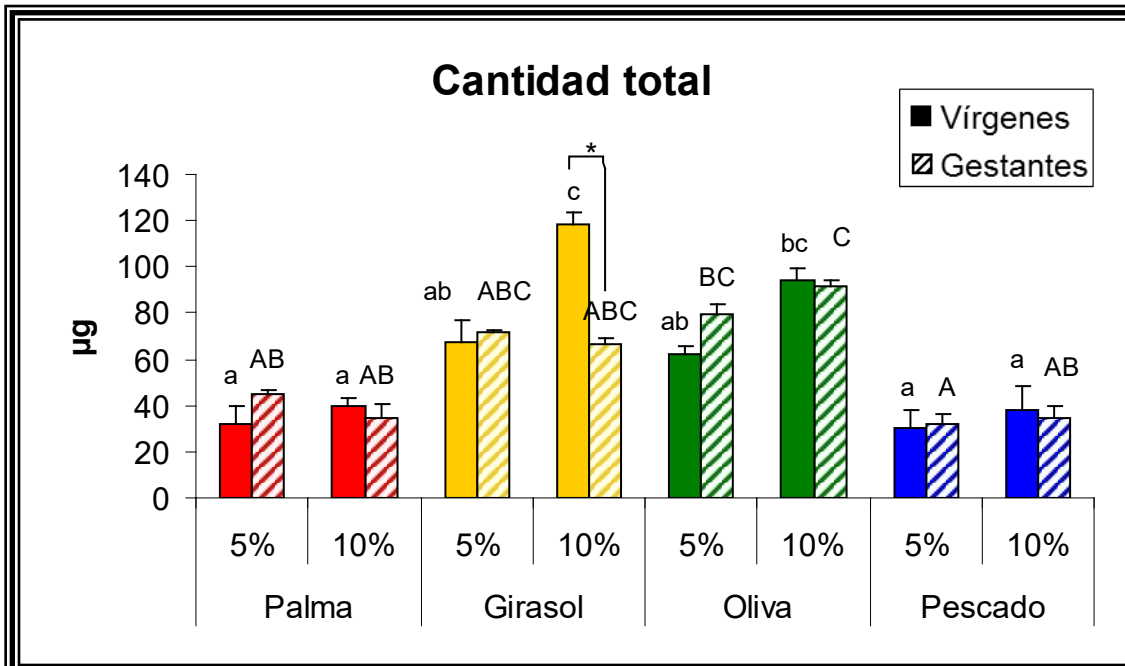
Al igual que en los hígados, dado que el peso del tejido adiposo también se encontró que variaba con la gestación y con el porcentaje de grasa en la dieta, interesó calcular la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol acumulada en el tejido adiposo lumbar multiplicando la concentración medida por el peso del órgano. Los resultados así obtenidos se resumen en la Fig. 37 y en los Cuadro 26 y Cuadro 27.

*Tipo de dieta:* Al analizar la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo lumbar, al contrario que al estudiar la concentración en este tejido, sí se aprecian los efectos de tomar una dieta u otra, pues este factor tiene una influencia muy significativa sobre el modelo estadístico, como se indica en el Cuadro 26. Se puede observar en el Cuadro 27 que los valores de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en adiposo según el tipo de dieta se agrupan en dos subconjuntos: los valores de las dietas de aceite de pescado y de grasa de palma son homogéneos entre sí y son menores que los valores de las dietas de oliva y girasol.

*Porcentaje de grasa:* Cuanto mayor es el porcentaje de grasa en la dieta, mayor es el contenido en  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo, como se indica en los Cuadros 26 y 27.

*Gestación:* En este parámetro (cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en adiposo), la gestación no influye significativamente, como se indica en el Cuadro 26, de manera que la disminución observada en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo (Cuadros 24 y 25) se compensa con la mayor cantidad de tejido de las preñadas y así los valores de cantidad de  $\alpha$ -tocoferol dependen sólo del tipo y cantidad de grasa ingerida.

*Interacción de la gestación y el porcentaje de grasa:* La única interacción de dos factores que resulta significativa es la del factor “gestación” con el valor “porcentaje” (Cuadro 26) y esto está relacionado con el hecho de que los valores observados en dos de los grupos escapan completamente de la tendencia general: la media de los valores de G10V son más altos de lo esperado y los de G10G más bajos y así, la diferencia entre estos dos grupos es la única entre vírgenes y preñadas que tomaran la misma dieta que alcanza significación estadística (Fig. 37).



**Fig. 37:** Cantidad total de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas y en ratas vírgenes sometidas al mismo tratamiento. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de ratas vírgenes y mayúsculas entre todas las preñadas. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de vírgenes y preñadas de un mismo tipo de dieta y porcentaje de grasa se indica mediante asteriscos: \*, p<0.05

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.0000
Gestación	0.6
Porcentaje	0.04
INTERACCIONES	
Dieta-Gestación	0.2
Dieta-Porcentaje	0.3
Gestación-Porcentaje	0.04
Dieta-Gestación-Porcentaje	0.02

Dieta	G.H.	Gestación	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	Preñadas	X	5%	X
Palma	X	Vírgenes	X	10%	X
Girasol	X				
Oliva	X				

**Cuadro 27:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la cantidad de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar.

**Cuadro 26:** Comparación de las medias de la cantidad de α-tocoferol en tejido adiposo lumbar en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las espas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos). Los grupos se ordenan según su media de arriba a abajo, de menor a mayor.

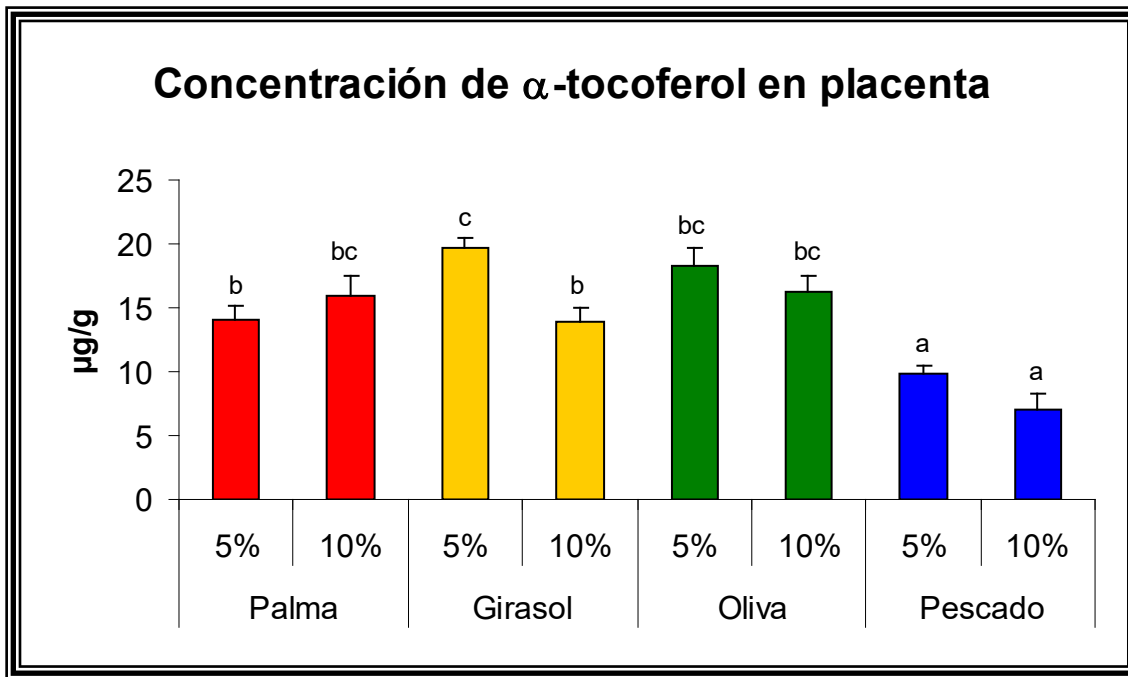
#### 4.2.1.3.4 $\alpha$ -Tocoferol en placenta

Los resultados obtenidos para cada uno de los 8 grupos experimentales se representan en la Fig. 38 y en los Cuadros 28 y 29.

*Tipo de dieta:* De nuevo la dieta produce una respuesta muy diferente en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, en este caso en las placentas (Cuadro 28). La concentración en los grupos de ratas que tomaron durante la gestación la dieta de aceite de pescado es menor que en los otros grupos, que presentan niveles homogéneos entre sí (Cuadro 29).

*Porcentaje de grasa:* En los Cuadros 28 y 29 se puede apreciar que el porcentaje de grasa en la dieta, en términos globales, disminuye la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, aunque sólo en el caso de la dieta de aceite de girasol la diferencia entre los valores de 5 y de 10% es estadísticamente significativa (Fig. 38).

*Interacción del porcentaje de grasa y el tipo de dieta:* La interacción entre los dos factores también es significativa, como se aprecia en el Cuadro 28. Esto significa que la variación debida al porcentaje de grasa en la dieta es distinta según el tipo de grasa que se trate y la disminución en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta asociada al aumento del porcentaje de grasa es más acusada cuanto más insaturada sea la dieta. En la Fig. 38 se puede observar que, con la grasa de palma, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta aumenta cuando aumenta la cantidad de grasa en la dieta, mientras que con la dieta de oliva disminuye un poco y con las dietas de aceite de girasol y de pescado disminuye aún más. De todas formas, es de resaltar la menor concentración que se presenta de nuevo en los dos grupos de aceite de pescado con relación a los otros dos grupos (Fig. 38). Este menor aporte de  $\alpha$ -tocoferol en las ratas preñadas alimentadas con dieta de aceite de pescado, lógicamente ha de influir en su llegada al feto.



**Fig. 38:** α-Tocoferol en placenta de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas. Los datos se presentan en forma de media±SEM. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Dieta	0.0000
Porcentaje	0.01
INTERACCIONES	
Dieta-Porcentaje	0.04

Dieta	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	10%	X
Palma	X	5%	X
Oliva	X		
Girasol	X		

**Cuadro 28:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de α-tocoferol en placenta.

**Cuadro 29:** Comparación de las medias de la concentración de α-tocoferol en placenta en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las aspas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos).

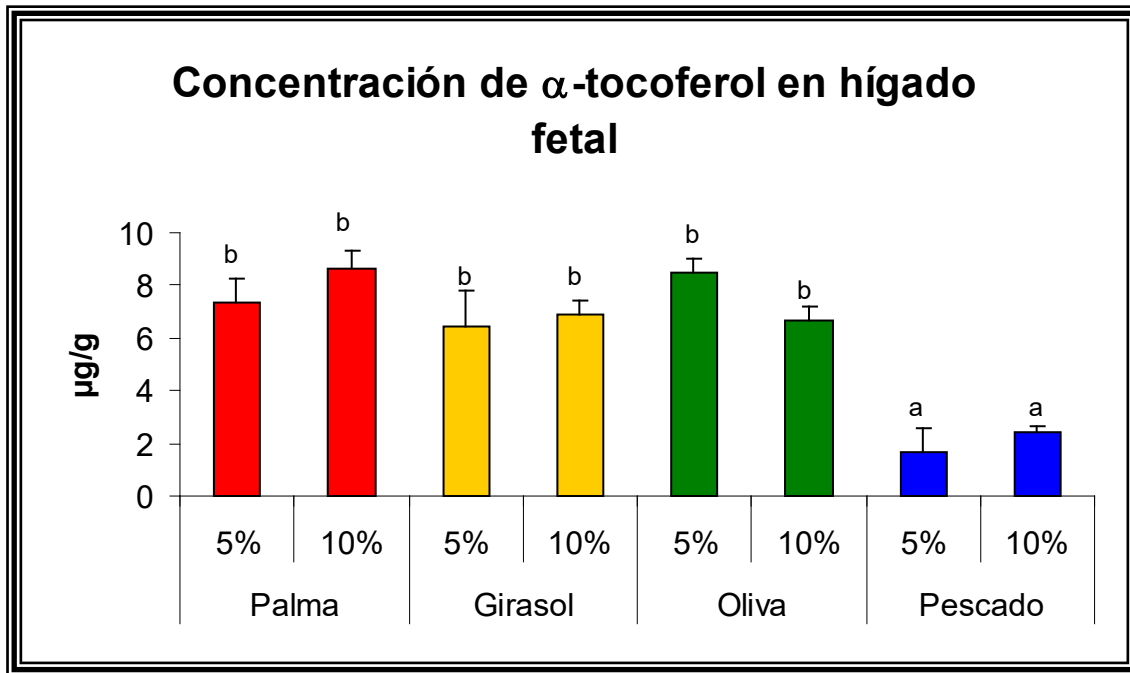


#### **4.2.1.3.5 $\alpha$ -Tocoferol en hígado fetal**

Para saber cómo las variaciones en la dieta materna afectaban a la disponibilidad de vitamina E en los fetos, se analizaron los hígados fetales. Se deseaba analizar también los plasmas de estos mismos fetos, pero no hubo cantidad de muestra suficiente con garantía analítica para poder sacar conclusiones válidas. Los resultados obtenidos para cada uno de los 8 grupos experimentales se representan en la Fig. 39 y en los Cuadros 30 y 31.

En todos los casos la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en los hígados de los fetos es mucho más baja que en los hígados maternos, y, como se indica en los Cuadros 30 y 31, con la dieta de pescado la concentración hepática fetal de  $\alpha$ -tocoferol es menor que en los otros tres grupos, entre los que no hay diferencias estadísticamente significativas.

No hay variaciones en el  $\alpha$ -tocoferol de los hígados de los fetos según el porcentaje de grasa en la dieta de sus madres (Cuadros 30 y 31) y tampoco existe ninguna evidencia de interacción entre el tipo de grasa y la cantidad de grasa sobre la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado fetal, como se presenta en el Cuadro 30.



**Fig. 39:**  $\alpha$ -Tocoferol en hígado de fetos de ratas a día 20 de gestación alimentadas con distintas dietas. Los datos se presentan en forma de media $\pm$ SEM. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Porcentaje	0.7
Dieta	0.0000
INTERACCIONES	
Dieta-Porcentaje	0.1

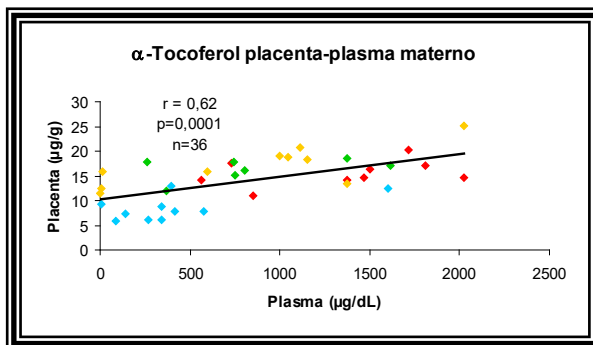
Dieta	G.H.	%	G.H.
Pescado	X	10%	X
Girasol	X	5%	X
Oliva	X		
Palma	X		

**Cuadro 31:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal.

**Cuadro 30:** Comparación de las medias de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las aspas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos).

### 4.2.1.3.6 Correlaciones

Dada la importancia de la placenta para el transporte de nutrientes al feto, se realizaron correlaciones lineales con los datos individuales de los niveles (plasmáticos) de  $\alpha$ -tocoferol maternos y la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta y en el hígado fetal. Los resultados correspondientes a la correlación entre  $\alpha$ -tocoferol en la placenta y en el plasma materno se representan en la Fig. 40. A su vez, en la Fig. 41 se presentan los resultados al evaluar la correlación entre la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta y la del hígado fetal y en la Fig. 42 entre el plasma materno y el hígado fetal.

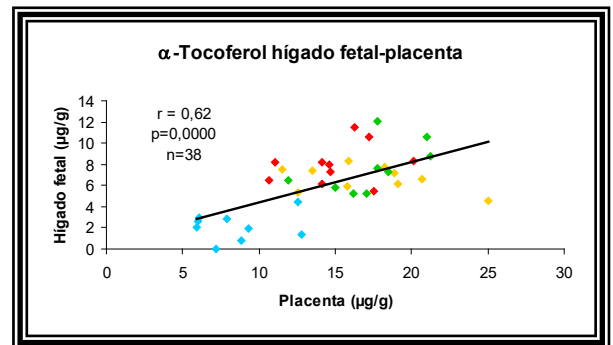


**Fig. 40:** Correlación entre las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y en placenta de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas

- ◆ Palma
- ◆ Girasol
- ◆ Oliva
- ◆ Pescado

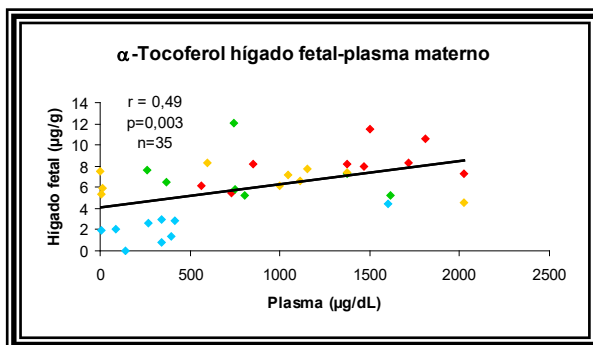
**Fig. 41:** Correlación entre las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en placenta y en hígado fetal de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas

- ◆ Palma
- ◆ Girasol
- ◆ Oliva
- ◆ Pescado



**Fig. 42:** Correlación entre las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en hígado fetal y en plasma de ratas preñadas alimentadas con distintas dietas

- ◆ Palma
- ◆ Girasol
- ◆ Oliva
- ◆ Pescado



Todas las correlaciones son altamente significativas, indicando que la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol de la que va a disponer el feto en el momento del nacimiento depende fuertemente de la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que pueda suministrar la placenta y este órgano a su vez tiene una concentración de  $\alpha$ -tocoferol muy relacionada con los niveles plasmáticos.

## 4.2.2 Experimento 2: Ingesta de dietas con aceite de oliva o pescado durante la gestación y la lactancia

La disminución en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma y tejidos de las ratas que tomaban la dieta de aceite de pescado, cualquiera que fuera su proporción de grasa, y, particularmente, en el hígado fetal, nos llevó a plantear a continuación la posibilidad de que esta disminución en la etapa fetal pudiera tener consecuencias negativas en el desarrollo postnatal. De hecho, desde el descubrimiento de la vitamina E se sabe que es necesaria para que la reproducción ocurra satisfactoriamente. Esto nos llevó a un nuevo experimento en el que se determinaron, entre otros, parámetros relacionados con el desarrollo postnatal en las crías de madres a las que se administró durante la gestación y la lactancia la dieta conteniendo 10% de aceite de pescado (dieta PE) y como referencia se empleó el desarrollo de crías cuyas madres tomaron la dieta con un 10% de aceite de oliva (dieta O), también durante toda la gestación y lactancia.

Dado que las dietas se prepararon de la misma forma que en el experimento anterior, el contenido en vitamina E en estas dietas fue igual al previamente medido y representado en la Fig. 30.

Todas las comparaciones estadísticas de este experimento se hicieron dos a dos, contrastando la hipótesis de la igualdad de medias mediante la  $t$  de Student, tras comprobar la homogeneidad de varianzas. Cuando las diferencias resultaron ser significativas ( $P > 95\%$ ), se indica en las respectivas figuras mediante asteriscos: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

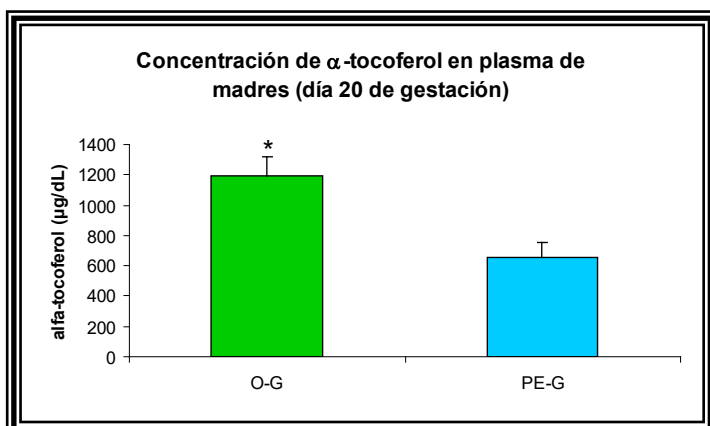
### 4.2.2.1 $\alpha$ -Tocoferol en la gestación

Parte de los animales fueron sacrificados en el día 20 de gestación, con el fin de tener datos acerca de los valores en plasma y cerebro de las crías, de los que en el experimento previo no se pudo disponer.

Al estudiar la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma materno (Fig. 43), se pudo comprobar que en las madres se reproducían los resultados del experimento anterior (Fig. 32), de forma que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de las madres era igual a la encontrada previamente, es decir, mucho más baja en las ratas alimentadas con dieta de aceite de pescado que en las de aceite de oliva.

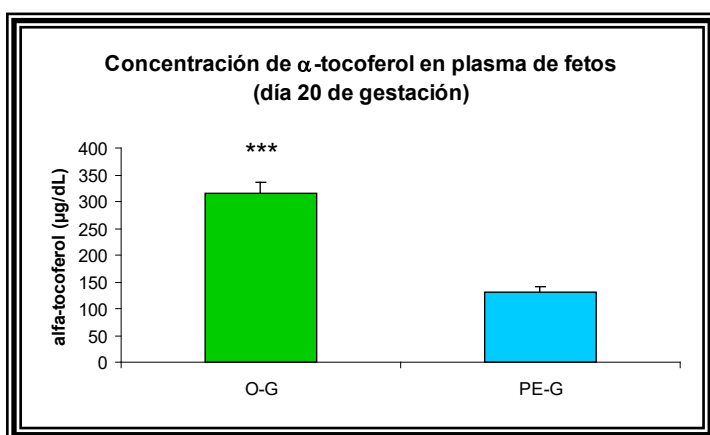
En el plasma de los fetos de estas madres (Fig. 44) se encontró que la concentración era muy inferior a la de las madres correspondientes (los fetos de O-G, 3.8 veces menos y los de PE-G, 5.0 veces menos). A su vez, también observamos la misma tendencia que se observó en los

hígados fetales del experimento anterior (Fig. 39): las muestras que provenían de los fetos del grupo PE-G tenían una menor concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol que las del grupo O-G.



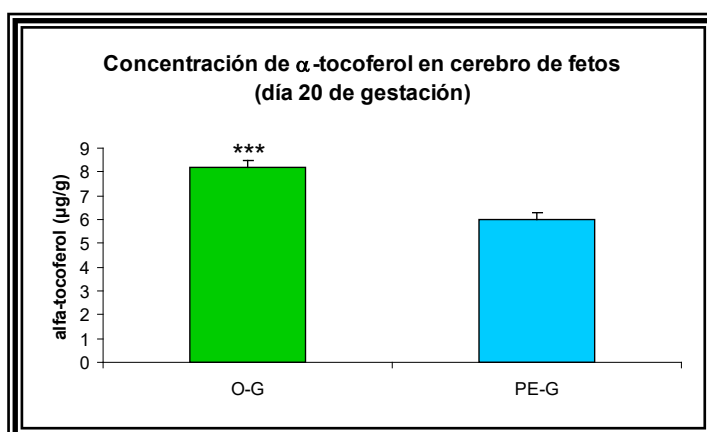
**Fig. 43:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de ratas preñadas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-G vs PE-G \*,  $p < 0.05$

Aunque proporcionalmente las diferencias entre los dos grupos en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el cerebro de los fetos no fueron tan grandes como en plasma, como se aprecia en la Fig. 45, sí fueron altamente significativas, debido sobre todo a la homogeneidad de los datos dentro de cada grupo. Así, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro es más baja en los fetos de madres que ingieren la dieta de aceite de oliva, siendo la diferencia altamente significativa.



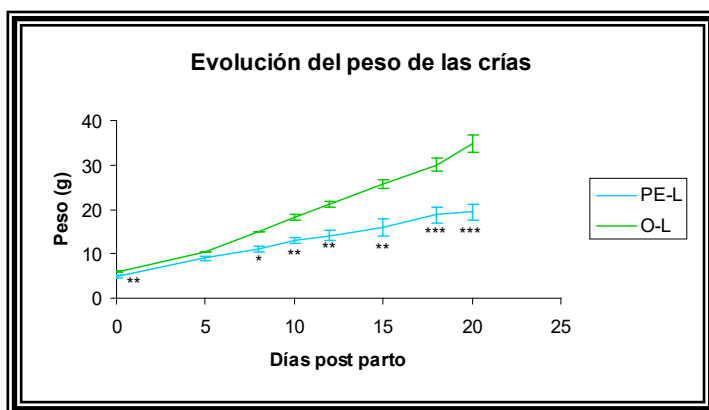
**Fig. 44:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de fetos de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-G vs PE-G \*\*\*,  $p < 0.001$

**Fig. 45:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro de fetos de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-G vs PE-G \*\*\*,  $p < 0.001$



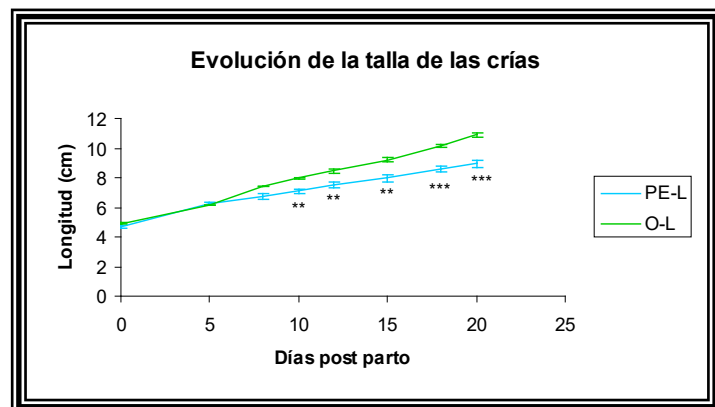
#### 4.2.2.2 Desarrollo tras el nacimiento

En las Figs. 46 y 47, se presenta el peso corporal y la talla de las crías de madres alimentadas con dieta de pescado o de oliva durante la gestación y la lactancia (PE-L y O-L). Desde el día del nacimiento, las crías PE-L presentan un menor peso corporal que las crías O-L y esta diferencia se hace especialmente manifiesta a partir del día 8 de lactancia, en que las diferencias en el peso entre las crías O-L y PE-L de la misma edad son significativas y se van haciendo cada vez mayores. La talla de las crías PE-L fue significativamente menor que en O-L a partir del día 10 de lactancia, diferencia que al igual que en el caso del peso se fue haciendo mayor a lo largo de la lactancia.



**Fig. 46:** Evolución postnatal del peso de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

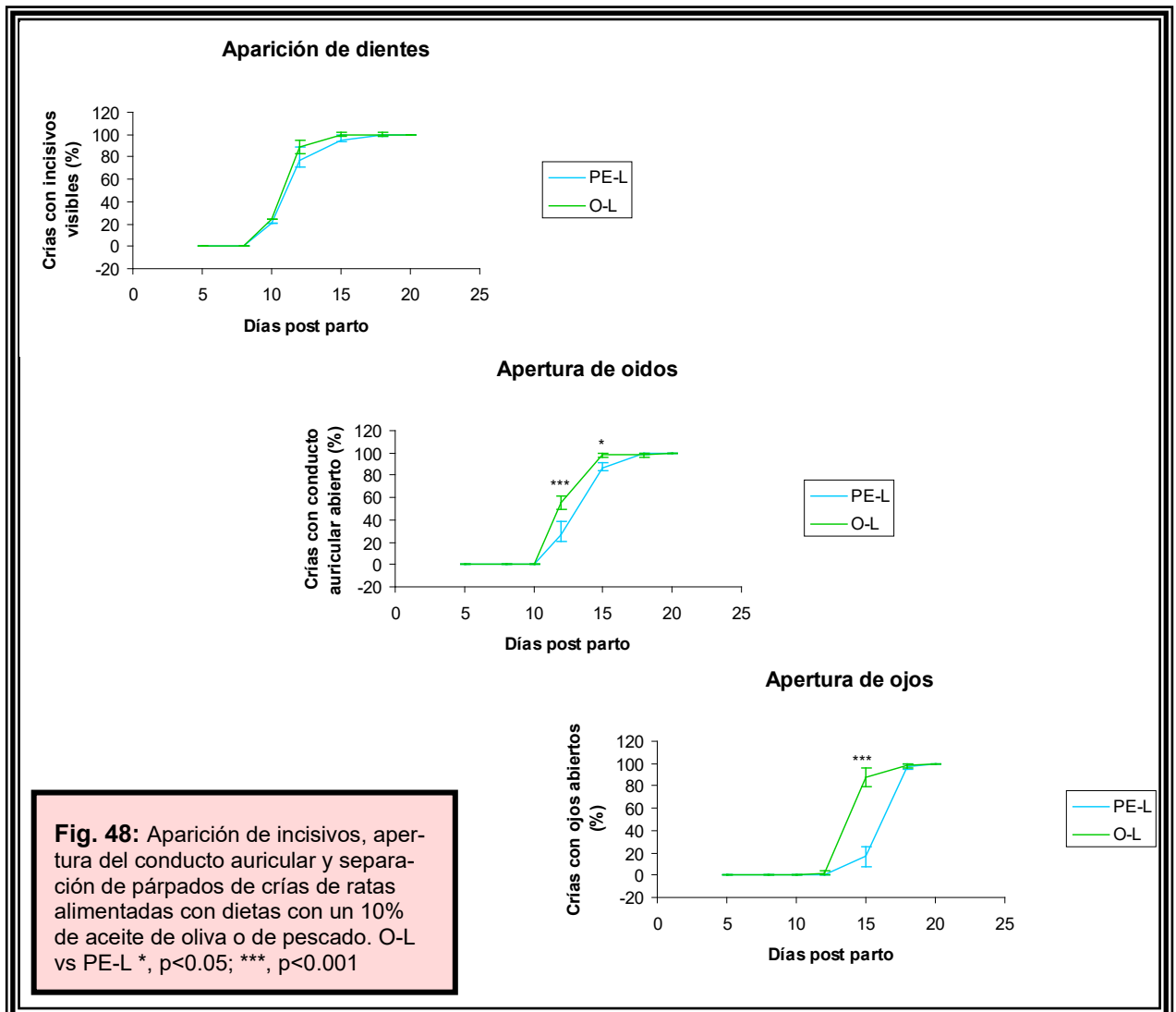
**Fig. 47:** Evolución postnatal de la talla de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$



En el desarrollo postnatal de la rata, la aparición de incisivos, la apertura del conducto auricular y la separación de los párpados son acontecimientos que ocurren en un momento determinado y los retrasos en la aparición de estas características son indicativos de un mal desarrollo. Por ello interesó determinar en qué momento ocurrían estos acontecimientos y los resultados se muestran en la Fig. 48.

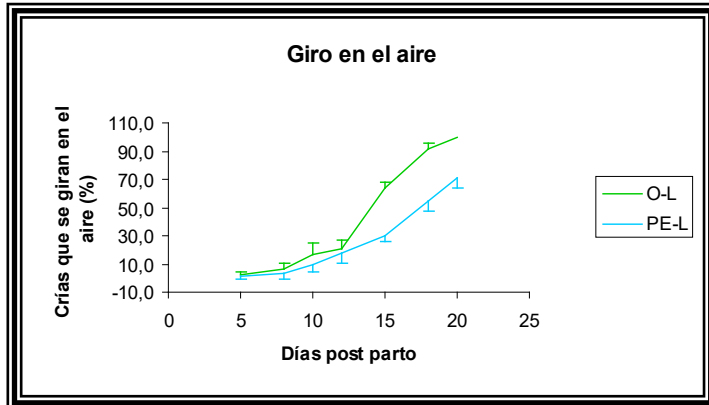
Aunque no se observan diferencias significativas entre los grupos en el tiempo de aparición de incisivos (Fig. 48), la apertura del conducto auditivo (Fig. 48) se produce antes en las crías O-L que en las PE-L. De hecho, las diferencias a día 12 de lactancia ya son significativas y también

a día 15 y la totalidad de las crías PE-L no adquieren esta característica hasta el día 18. Al estudiar la apertura de ojos se encontró que en el día 15 casi un 90% de las crías O-L tenían ya abiertos los ojos, mientras que en ese mismo día sólo alrededor de un 17% de las crías PE-L lo consiguieron (Fig. 48).



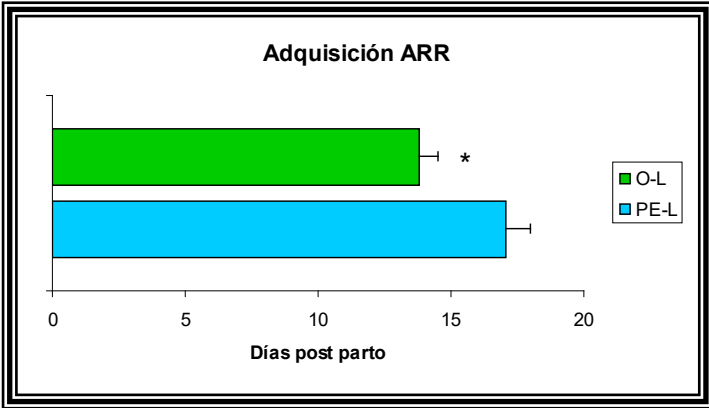
Para evaluar la adquisición del reflejo de caída libre (ARR), una vez obtenidos los datos del porcentaje de crías de la camada que en un día determinado presentaban la capacidad de girarse en el aire, representados en la Fig. 49, se transformaron los datos porcentuales a unidades "probit" [563]. Al representar estas unidades "probit" frente al tiempo se obtuvieron representaciones en forma de rectas de adquisición del reflejo, de manera que se puede obtener una estimación del día en el que el 50% de la camada había adquirido el reflejo ( $I_{50}$ ). En la Fig.

50 se representa la media de los respectivos I<sub>50</sub>, donde se observa que la adquisición de este reflejo de caída libre es más tardía en las crías PE-L que en las O-L.



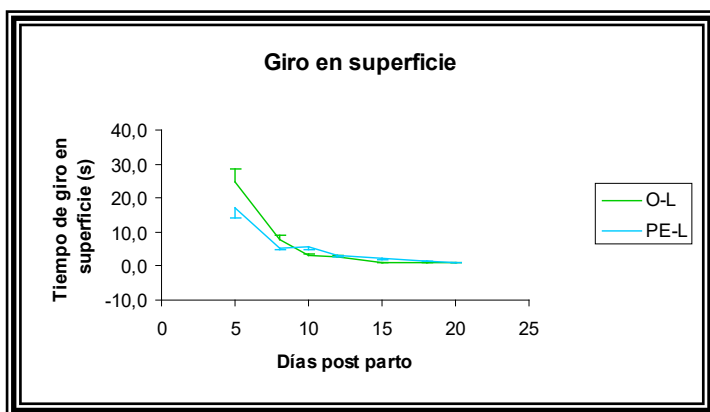
**Fig. 49:** Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado

**Fig. 50:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado O-L vs PE-L \*, p<0.05



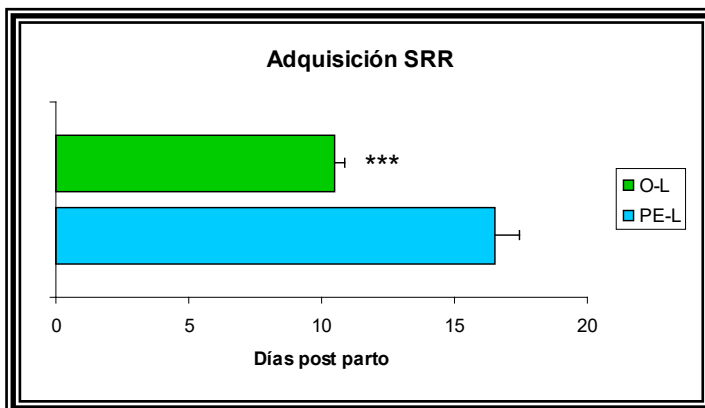
En el caso de la adquisición del reflejo de giro en superficie (SRR), se cronometró el tiempo que las crías tardaban en girarse colocadas boca arriba sobre un almohadón y la media de esos tiempos se representa en la Fig. 51. Para una mejor evaluación de los resultados, se consideró como completamente adquirido el reflejo cuando no sólo conseguían girarse, sino que tardaban menos de un segundo en hacerlo. Con estos resultados se pudo llevar a cabo la transformación “probit”, y, como en el caso del test del ARR comentado antes, representar el I<sub>50</sub> (Fig. 52). Se encontró que las crías PE-L también tardaban más en adquirir el SRR que las crías O-L, siendo esta diferencia altamente significativa.





**Fig. 51:** Adquisición del reflejo de giro en superficie de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado

**Fig. 52:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado O-L vs PE-L \*\*\*,  $p < 0.001$

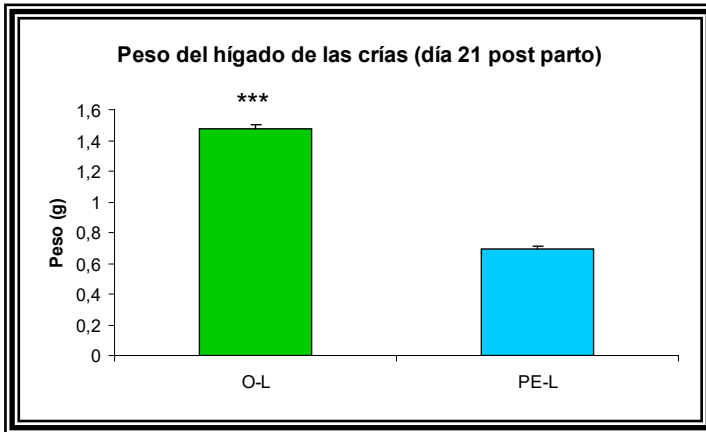


**Fig. 53:** Dos crías en el día 12 de lactancia pertenecientes a una camada O-L (a la izquierda) y a una camada PE-L (a la derecha)

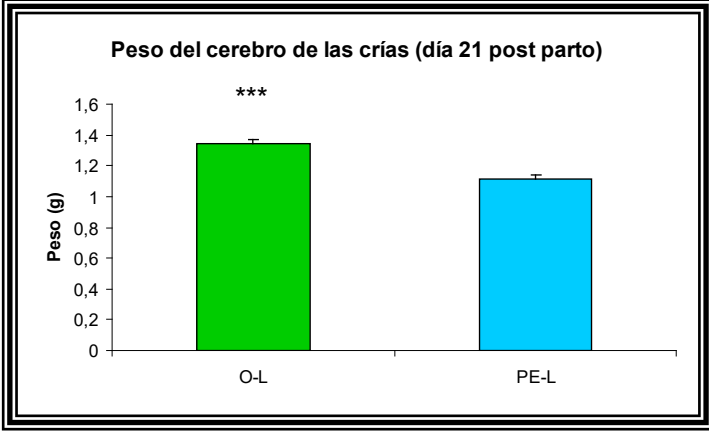
Todo lo comentado anteriormente muestra que existe un marcado retraso en el desarrollo de las crías PE-L con respecto a las crías O-L, cuyas madres tomaban la dieta de aceite de oliva. Esto se recoge de una manera más gráfica en la Fig. 53, en la que se observan dos crías representativas de ambas camadas y se puede apreciar cómo en el mismo día de la lactancia (día 12), las crías PE-L presentan un aspecto físico mucho menos desarrollado que las crías O-L.

De forma paralela a los pesos corporales, las crías PE-L presentan un tamaño del hígado menor en el día 21 de lactancia, como se presenta en la Fig. 54. La diferencia de peso entre los cerebros, que se puede apreciar en la Fig. 55, también es muy significativa, pero de nuevo hay que resaltar

el que, con una diferencia tan pequeña entre ambas medias (el peso de los cerebros de las crías O-L es sólo un 20% mayor que el de las PE-L, mientras que el hígado medio de las crías O-L pesa más del doble del hígado de las crías PE-L), la diferencia es muy significativa por la gran uniformidad de los datos.

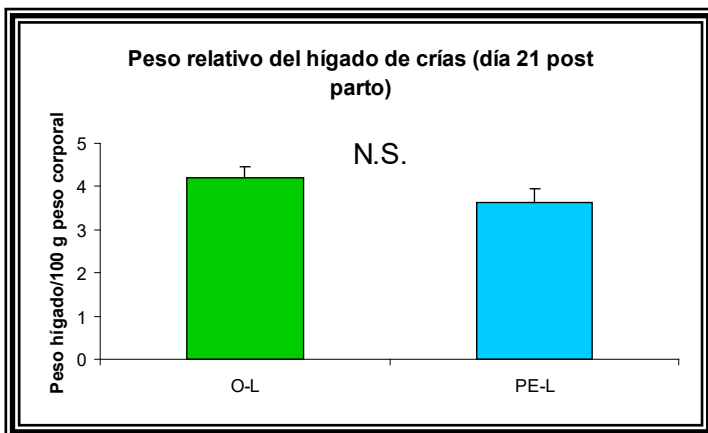


**Fig. 54:** Peso del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L \*\*\*, p<0.001



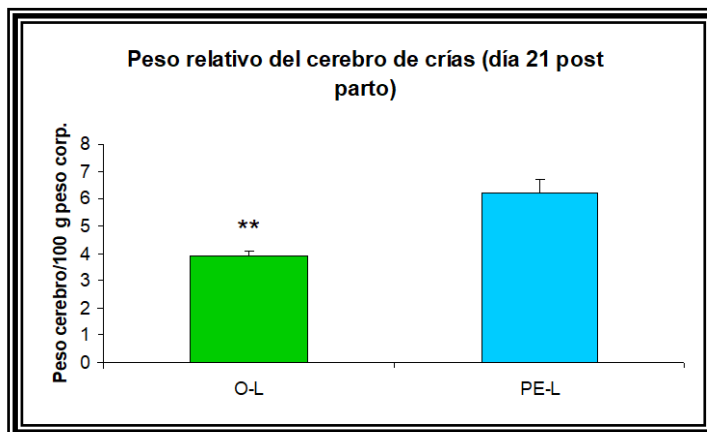
**Fig. 55:** Peso del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L \*\*\*, p<0.001

La disminución del tamaño del hígado, como se ha comentado, es paralela a la del peso corporal total, como se puede apreciar en el hecho de que el peso relativo del hígado, representado en la Fig. 56, no es distinto entre ambos grupos de crías. Sin embargo, en el caso del cerebro se puede observar en la Fig. 57 que, a pesar de que el tamaño corporal sea menor en el caso de las crías PE-L, el que la diferencia en el peso del cerebro sea tan pequeña implica que el tamaño relativo del cerebro de las crías PE-L es significativamente mayor que en las crías O-L.



**Fig. 56:** Peso relativo del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. N.S.: Diferencia no significativa

**Fig. 57:** Peso relativo del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L \*\*,  $p < 0.01$



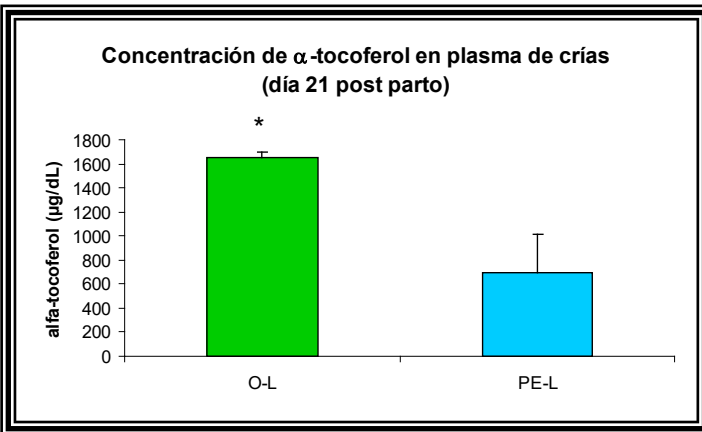
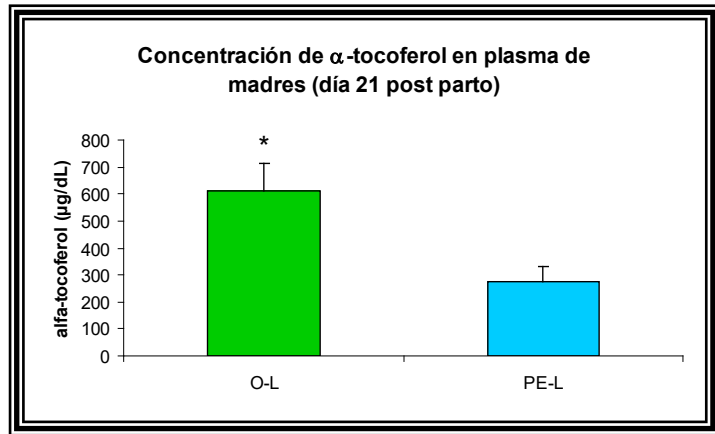
#### 4.2.2.3 $\alpha$ -Tocoferol en la lactancia

A las tres semanas tras el parto, correspondientes al final de la lactancia, se sacrificó a los animales y se analizó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma materno y en el plasma, hígado y cerebro de las crías.

La concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en las madres al final de la lactancia se presenta en la Fig. 58, en la que se aprecia que estos animales tenían menos  $\alpha$ -tocoferol en plasma que los que tomaron la misma dieta durante la gestación y fueron sacrificados antes del parto (Fig. 32 y 43) y están prácticamente al mismo nivel que las ratas no preñadas (Fig. 32). En las ratas PE-L se observa que, de nuevo, los niveles de  $\alpha$ -tocoferol son menores, lo que puede suponer que la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol que puedan suministrar a su descendencia en la leche esté disminuída.

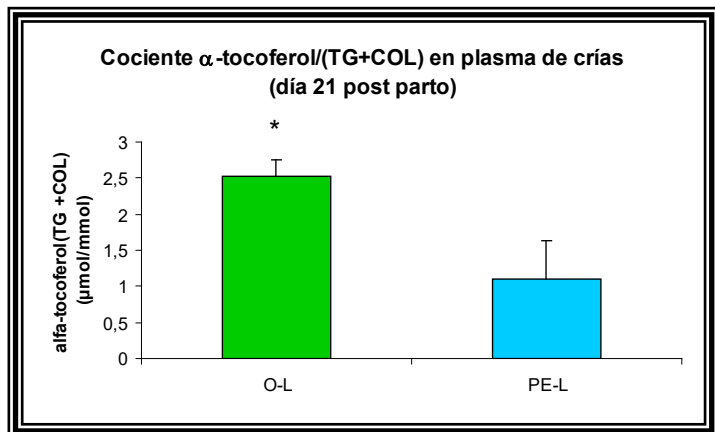
En la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las crías, representado en la Fig. 59, se observa la misma tendencia que en sus madres: Los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las crías PE-L son menores que los de las crías O-L. Hay que reseñar que en los datos del grupo PE-L se encontró que había dos subconjuntos de datos: uno (3 camadas) en el que los niveles de  $\alpha$ -tocoferol eran comparables a los del grupo O-L y otro (4 camadas) en el que eran muchísimo más bajos. A pesar de esta gran variabilidad, no se debía rechazar la hipótesis de la homogeneidad de varianzas y la comparación de medias se hizo como de costumbre. Esta diferencia en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol no es corregida por el contenido total en lípidos plasmáticos, como se puede apreciar en la Fig. 60, de forma que el cociente entre  $\alpha$ -tocoferol y lípidos plasmáticos es significativamente inferior en las crías PE-L que en las O-L.

**Fig. 58:**  $\alpha$ -tocoferol en plasma de madres alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$

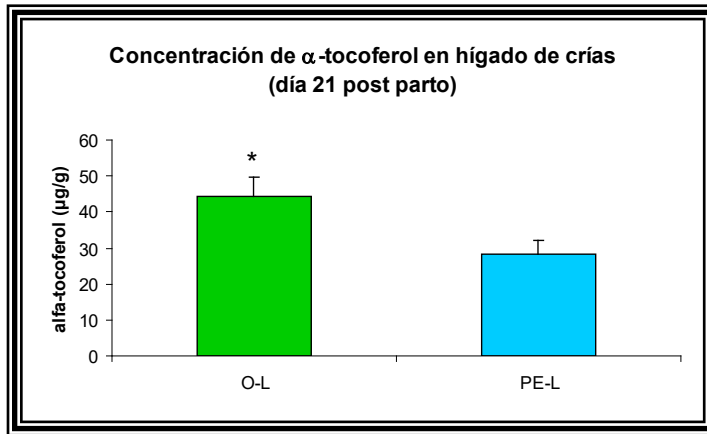


**Fig. 59:**  $\alpha$ -tocoferol en plasma de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$

**Fig. 60:** Cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$

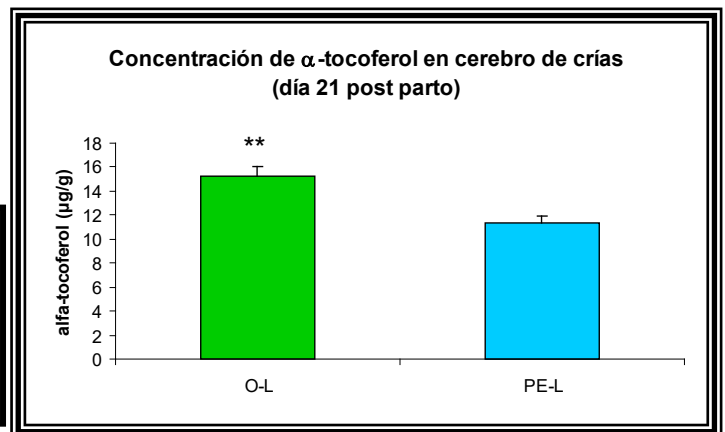


Estos resultados en plasma se corresponden con lo que se observa tanto en hígado (Fig. 61) como en cerebro (Fig. 62); es decir, que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en ambos tejidos en las crías PE-L es menor que en las de O-L. Resulta destacable de nuevo la alta uniformidad de los datos en cerebro, que lleva a que la diferencia, aunque pequeña, sea significativa.

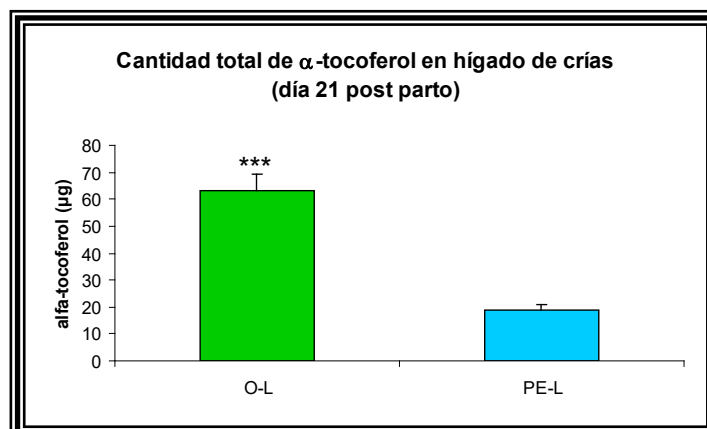


**Fig. 61:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$

**Fig. 62:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*\*,  $p < 0.01$



Dado que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de las crías PE-L es menor que en las crías O-L y que el hígado de las crías PE-L es más pequeño que el de las crías O-L, es lógico que las diferencias entre ambas dietas sean aún más acusadas al calcular la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en hígado, representada en la Fig. 63.

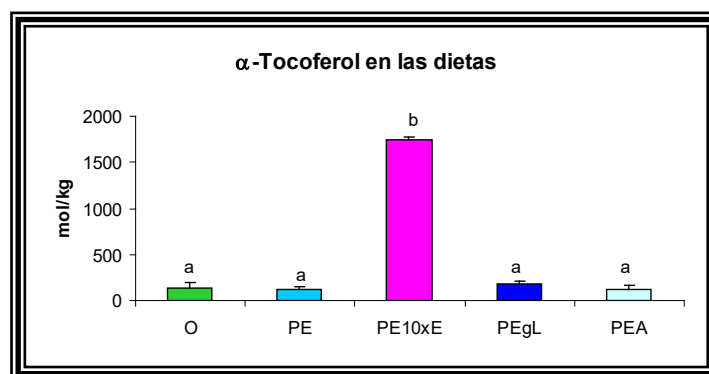


**Fig. 63:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado durante la gestación y la lactancia. O-L vs PE-L \*\*\*,  $p < 0.001$

### 4.2.3 Experimento 3: Ingesta durante la gestación y lactancia de dietas con aceite de oliva, pescado o pescado suplementadas

Con objeto de determinar si el retraso en el desarrollo detectado en las crías de madres alimentadas con la dieta PE era debido a la manifiesta deficiencia de vitamina E que presentaban, quisimos comprobar si la suplementación con vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol) durante la gestación y la lactancia era capaz de disminuir dicho retraso. Para ello, a un grupo de animales se les alimentó con una dieta de aceite de pescado suplementada con vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol). La suplementación suponía aumentar 10 veces la cantidad de vitamina E que se añadía a la dieta (dieta PE-10E). A su vez, para contrastar la posibilidad de que la causa del retraso no fuera la deficiencia de vitamina E, sino la deficiencia de ácido araquidónico, presente también en las ratas alimentadas con dieta PE, se administró a otros dos grupos de animales durante la gestación y la lactancia otras dos dietas, también suplementadas, una con ácido araquidónico ( $C_{20:4\omega-6}$ ), dieta PE-AA y otra con su inmediato precursor metabólico, el ácido  $\gamma$ -linolénico ( $C_{18:3\omega-6}$ ), dieta PE-gL.

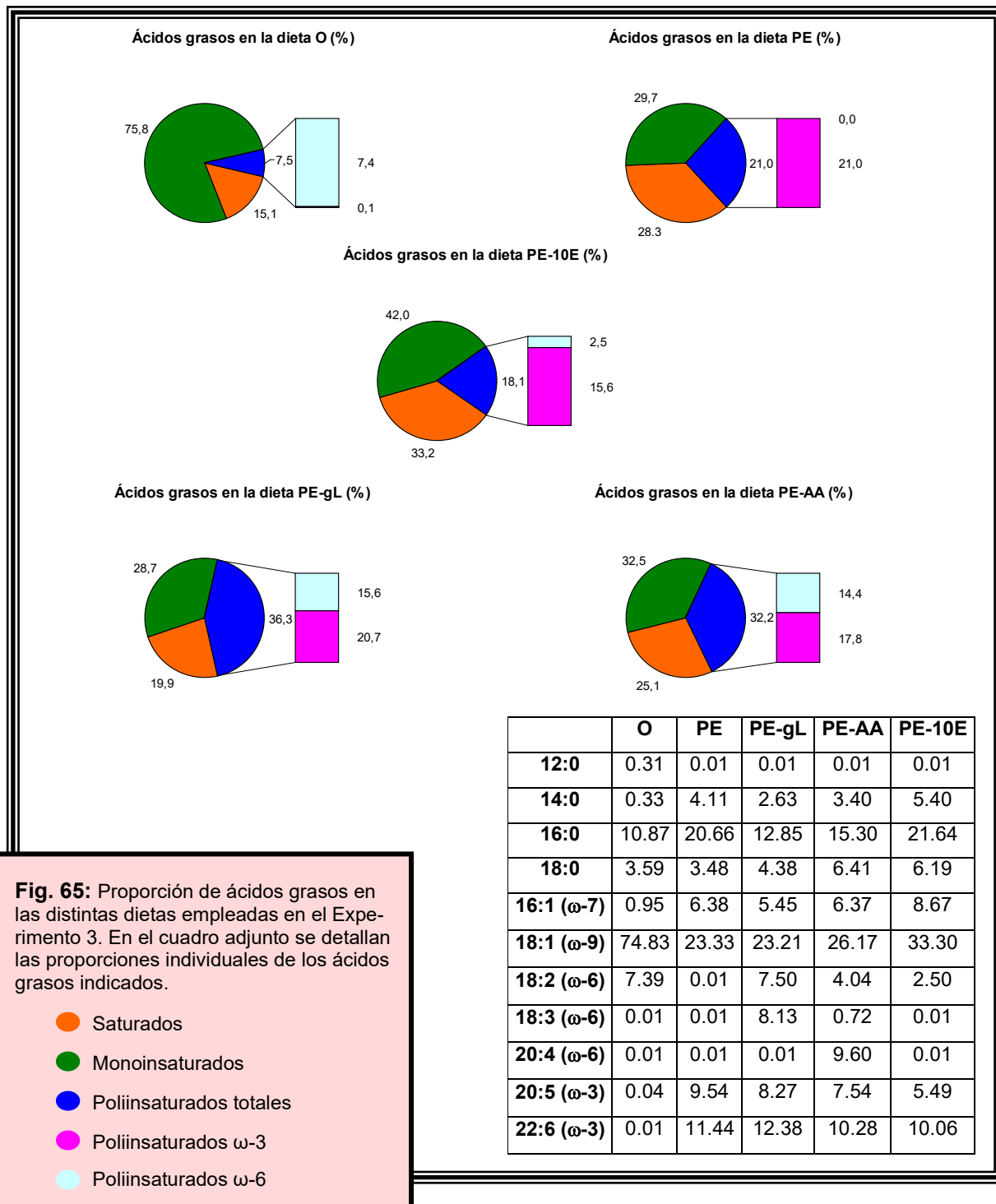
El contenido de  $\alpha$ -tocoferol en todas las dietas, excepto en la PE-10E, es similar, como se puede apreciar en la Fig. 64. En la dieta suplementada con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, la concentración disponible de  $\alpha$ -tocoferol es unas diez veces superior a la de las otras dietas.



**Fig. 64:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en las dietas empleadas en el Experimento 3. Los datos se presentan en forma de media  $\pm$  SEM. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

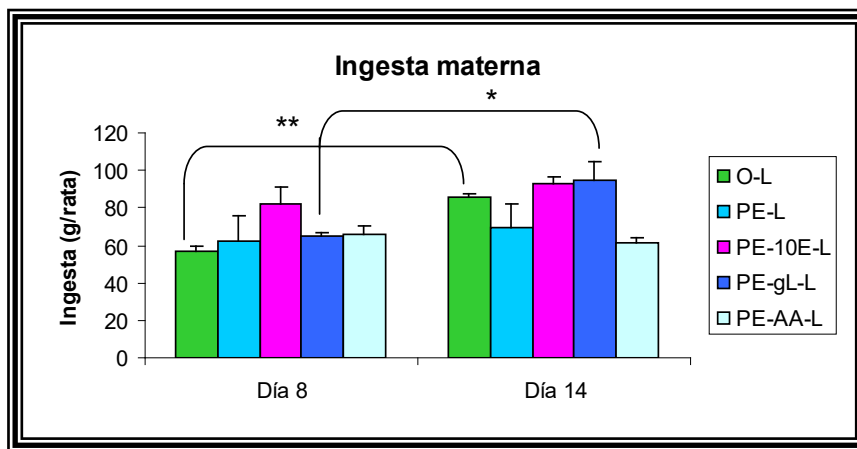
La composición porcentual de ácidos grasos de las distintas dietas empleadas en este experimento se representa en la Fig. 65. El aumento en el porcentaje de ácidos grasos de la serie  $\omega$ -

3 en las dietas PE-gL y PE-AA con respecto a la dieta PE se debe específicamente al incremento en la cantidad de ácido  $\gamma$ -linolénico en la dieta PE-gL y de ácido araquidónico en la dieta PE-AA.



### 4.2.3.1 Parámetros maternos

La dieta se administró *ad libitum* a las ratas durante la gestación y la lactancia y en dos momentos de la lactancia se controló la cantidad de dieta que se les dejaba en el comedero y la que quedaba tras 24 h, para estimar la cantidad real de dieta ingerida. Con estos datos se estimó la ingesta de cada animal y con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de dos vías basado en un modelo de dos niveles de interacción y se obtuvieron los correspondientes p-valoros asociados a las probabilidades de significatividad de cada factor e interacción, que se indican en el Cuadro 32. Tras estos ANOVAS se realizaron sendos tests de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (con un nivel de confianza del 95%) para cada uno de los dos factores ensayados (dieta y día) y los resultados se resumen en el Cuadro 33.



**Fig. 66:** Ingesta durante la lactancia de ratas alimentadas con distintas dietas. Los datos se presentan en forma de media±SEM. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las ingestas de cada uno de los días. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01

EFFECTOS PRINCIPALES	p
Día	0.005
Dieta	0.06
INTERACCIONES	
Dieta-Día	0.2

Dieta	G.H.	Día	G.H.
O	X	Día 8	X
PE	X	Día 14	X
PE-10E	X		
PE-gL	X		
PE-AA	X		

**Cuadro 33:** p-valor asociado a la probabilidad de que la influencia de los distintos factores e interacciones entre los factores sea significativa sobre la ingesta

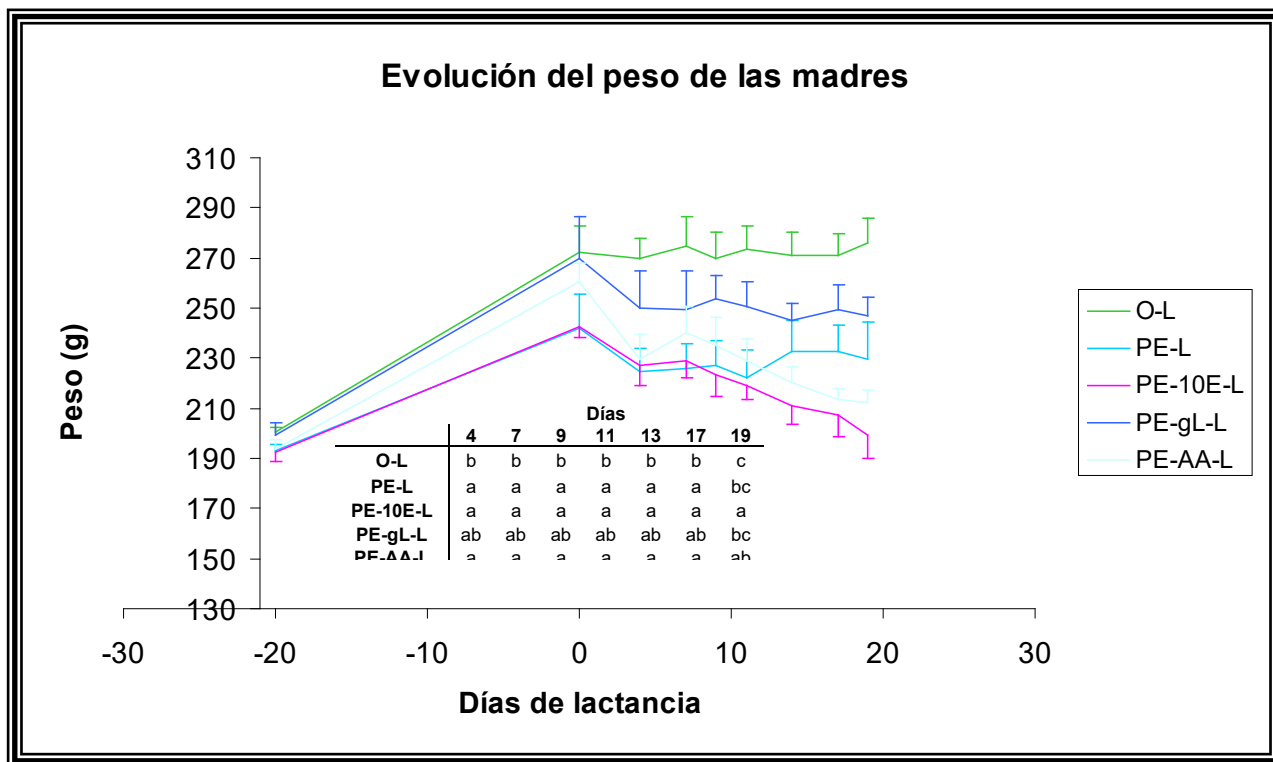
**Cuadro 32:** Comparación de las medias de la ingesta en cada uno de los grupos de los correspondientes factores de variación. Las aspas en una misma columna indican que las medias son homogéneas (G.H. = grupos homogéneos).

Se han realizado también ANOVAS de una vía con los datos de cada uno de los días, para posteriormente analizar las diferencias entre las medias mediante el test de comparaciones



múltiples de Student-Newman-Keuls, al 95%. Los resultados han sido negativos, es decir, en cada uno de los días no existe ningún grupo significativamente distinto de los otros. Dentro de cada dieta se compararon los datos de ambos días y en la Fig. 66 se muestra que sólo alcanza significación estadística la comparación entre la ingesta de día 8 y día 14 de las ratas O-L y de las ratas PE-gL-L.

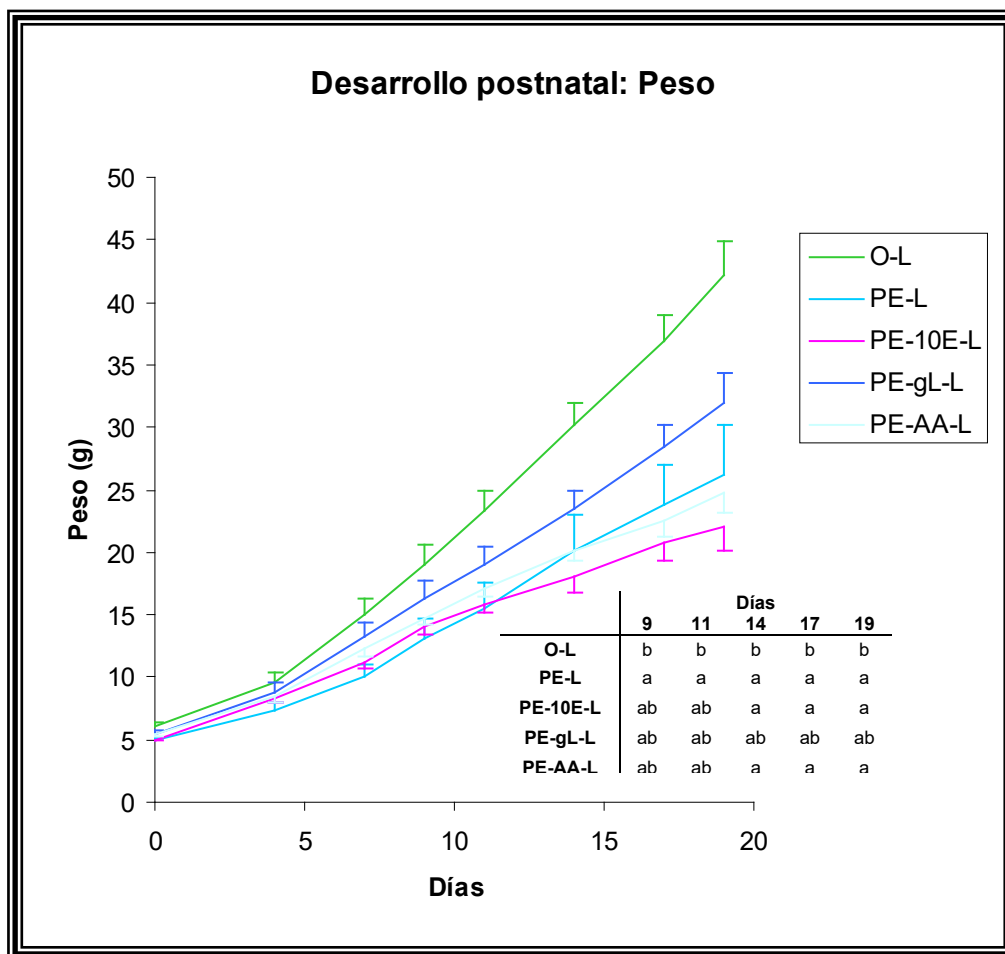
Como se aprecia en la Fig. 67, todos los grupos parten de un peso similar al inicio del experimento, correspondiente al día 0 de gestación. Aunque el día del parto las diferencias en peso corporal no llegan a ser significativas, se aprecian unas claras tendencias que acentúan las diferencias a lo largo de la lactancia. Así, como se muestra en la Fig. 67, mientras que las ratas O-L mantienen un peso más o menos constante a lo largo de la lactancia, las ratas PE-gL-L disminuyen ligeramente su peso durante los cinco primeros días después del parto para después mantenerse constante. Sin embargo, las madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado (PE-L), o con la misma dieta suplementada con vitamina E (PE-10E-L) o con ácido araquidónico (PE-AA-L) disminuyen significativamente de peso con respecto a las ratas O-L. Sin embargo, las diferencias entre las ratas PE-gL-L y las O-L no llegan a ser significativos ninguno de los días estudiados (Fig. 67).



**Fig. 67:** Peso corporal durante la lactancia de las ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva (O-L) o de pescado (PE-L) suplementadas o no con acetato de vitamina E (PE-10E-L), ácido  $\gamma$ -linolénico (PE-gL-L), o ácido araquidónico (PE-AA-L). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de un mismo día de lactancia ( $p < 0.05$ )

### 4.2.3.2 Parámetros de desarrollo postnatal

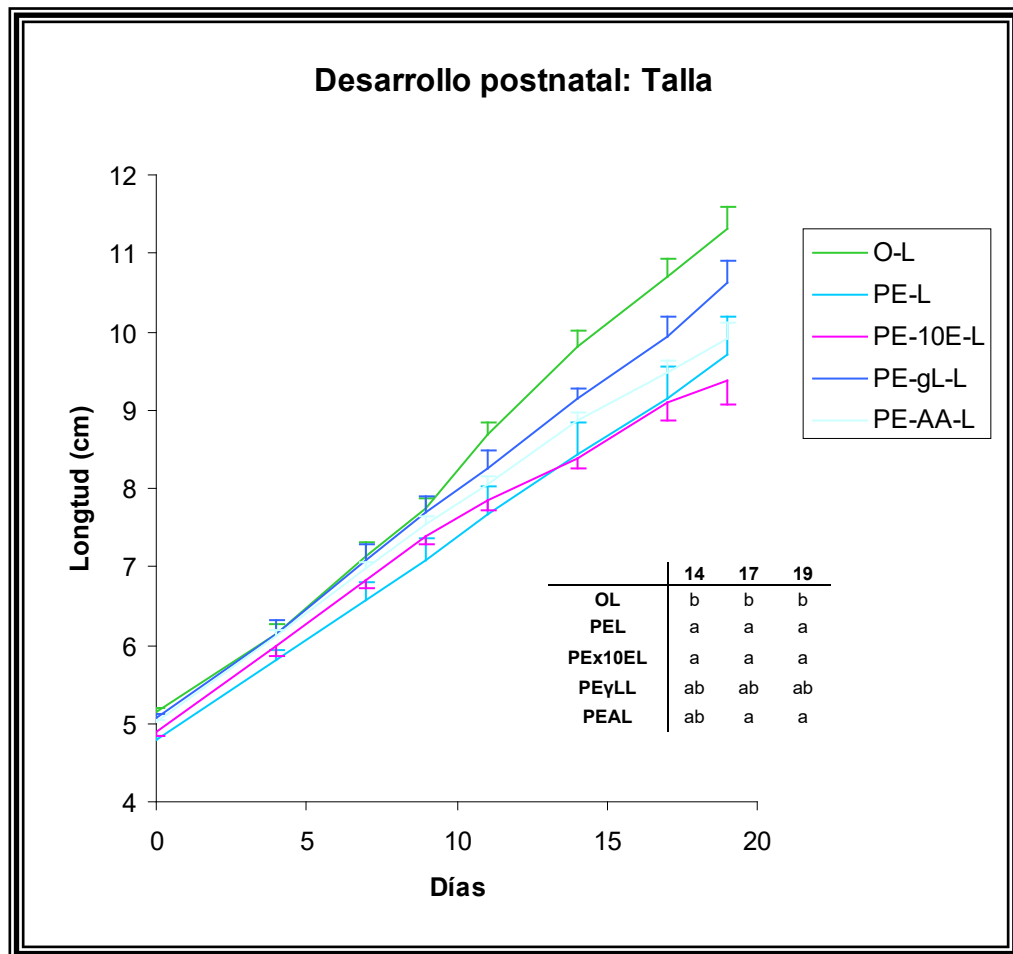
Como se aprecia en la Fig. 68, el incremento del peso de las crías O-L es más rápido que en el resto de los grupos. A pesar de ello, no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los días estudiados entre el peso de las crías PE-gL-L y las O-L. Sin embargo, a partir del día 11 de lactancia se observa una diferencia significativa en el peso de las crías O-L frente a las crías de PE-L, PE-10E-L y PE-AA-L, la cual se va haciendo mayor a medida que avanza el tiempo de lactancia (Fig. 68).



**Fig. 68:** Peso corporal durante la lactancia de las crías de ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva (O-L) o de pescado (PE-L) suplementadas o no con acetato de vitamina E (PE-10E-L), ácido  $\gamma$ -linolénico (PE-gL-L), o ácido araquidónico (PE-AA-L). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de un mismo día de lactancia ( $p < 0.05$ )

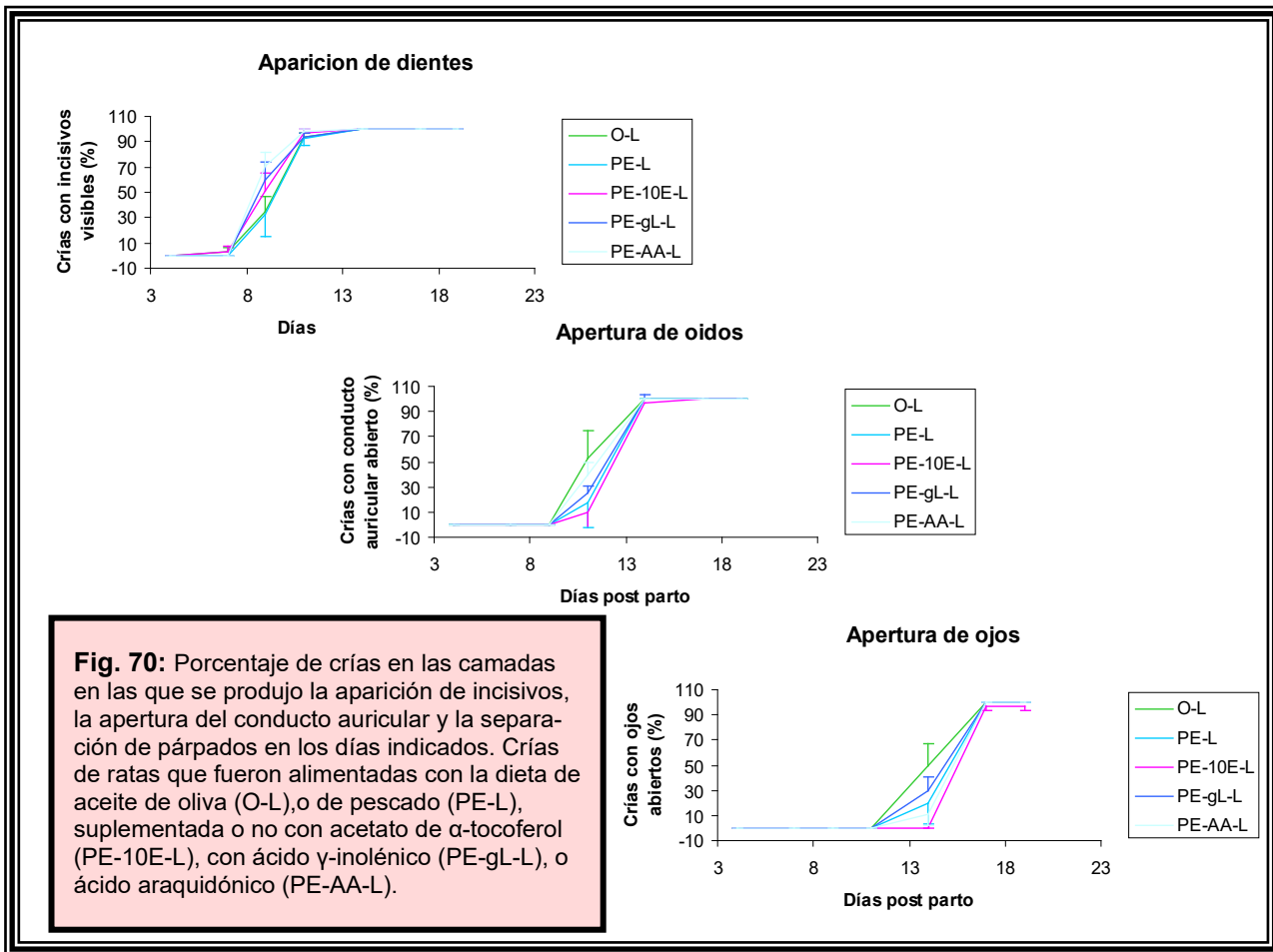
La evolución de la talla de los animales es similar a la del peso, aunque las diferencias entre los grupos son menos manifiestas (Fig. 69). En este caso, a pesar de existir una tendencia desde el día 9 de lactancia a que las crías O-L presenten un mayor tamaño que el resto, no se

producen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos hasta el día 14 de lactancia (Fig. 69). Por otra parte, no existen diferencias significativas en el tamaño de las crías O-L y PE-gL-L en ninguno de los días estudiados (Fig. 69).

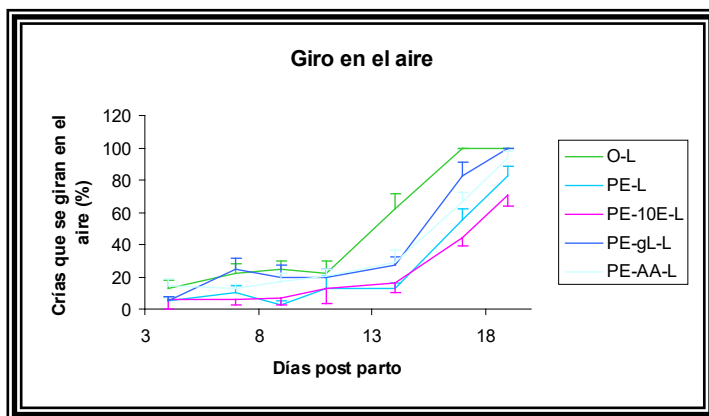


**Fig. 69:** Talla durante la lactancia de las crías de ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva (O-L) o de pescado (PE-L) suplementadas o no con acetato de vitamina E (PE-10E-L), ácido  $\gamma$ -linolénico (PE-gL-L), o ácido araquidónico (PE-AA-L). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de un mismo día de lactancia ( $p < 0.05$ )

Como se presenta en la Fig. 70, el porcentaje de crías en cada camada a las que en un determinado día les habían aparecido los incisivos, se les había abierto el conducto auricular o se les habían separado los párpados, era similar entre los distintos grupos de crías en cualquiera de los días de estudio. Sin embargo, se aprecia una tendencia a que en las crías del grupo que tomaban la dieta de aceite de pescado suplementada con vitamina E (PE-10E-L) se abran los oídos y los ojos más tarde que en el resto de los grupos (Fig. 70).

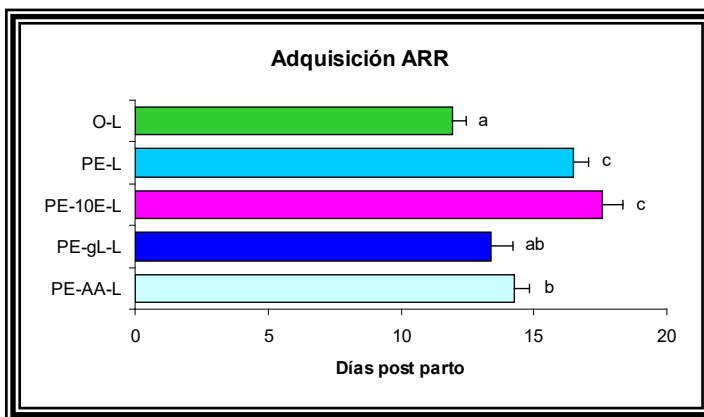


Para evaluar la adquisición del ARR, una vez obtenidos los datos del porcentaje de crías de la camada que en un día determinado presentaban la capacidad de girarse en el aire, representados en la Fig. 71, se transformaron los datos porcentuales a unidades "probit" [563]. En la Fig. 72 se representan las medias de los respectivos  $I_{50}$ , observándose que la suplementación con vitamina E no consigue mejorar los resultados de las crías cuyas madres tomaban la dieta de pescado (grupo PE-L), mientras que sí se acercan a los resultados del grupo O-L las crías de PE-gL-L y PE-AA-L.

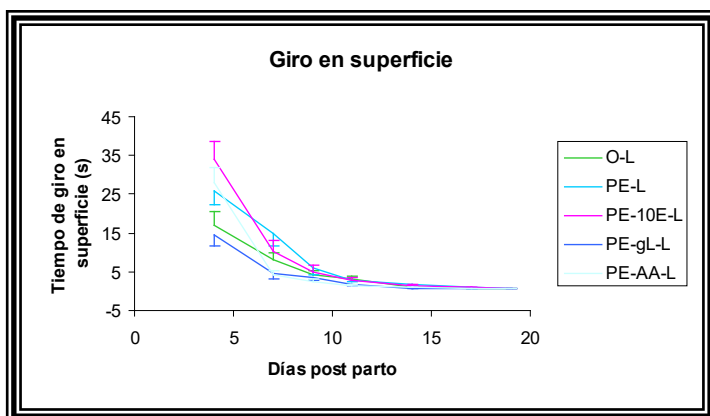


**Fig. 71:** Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -inolénico o ácido araquidónico.

**Fig. 72:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

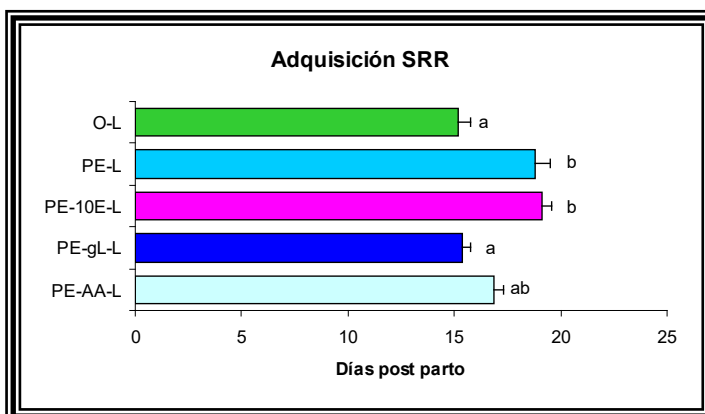


En el caso de la adquisición del SRR, se cronometró el tiempo que las crías tardaban en girarse y la media de esos tiempos se representa en la Fig. 73. Se consideró como completamente adquirido el reflejo cuando tardaban menos de un segundo en girarse. Con estos resultados se pudo llevar a cabo la transformación “probit” y representar el  $I_{50}$  (Fig. 74). Se encontró que las crías PE-L y las PE-10E-L también tardaban más que los otros grupos en adquirir esta habilidad. La suplementación con araquidónico no consigue la total recuperación en la adquisición de este reflejo, mientras que la suplementación con el ácido  $\gamma$ -linolénico sí consigue que las crías PE-gL-L alcancen los valores observados en el grupo O-L.

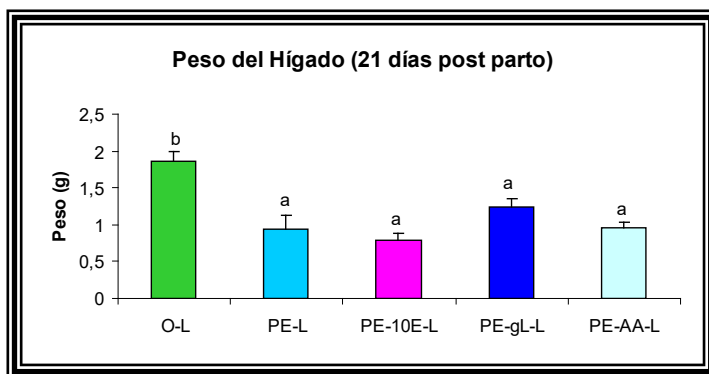


**Fig. 73:** Adquisición del reflejo de giro en superficie de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico.

**Fig. 74:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie. Crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

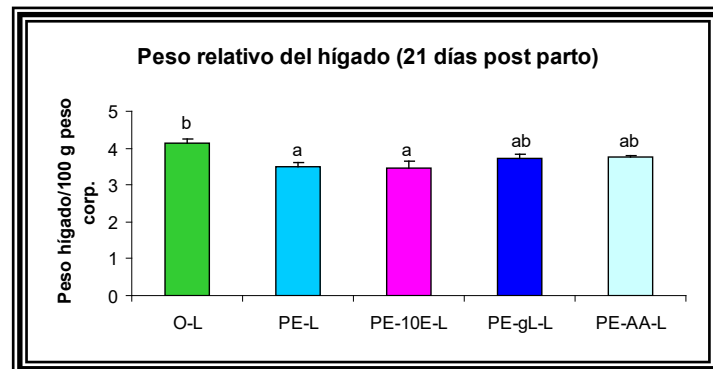


De acuerdo con el menor peso corporal observado en todos los grupos con dietas basadas en aceite de pescado frente al de las crías del grupo de aceite de oliva (O-L), ya observado en la Fig. 68, el peso del hígado de las crías PE-L, PE-10E-L, PE-gL-L y PE-AA-L era homogéneo, e inferior al de las crías O-L, como se aprecia en la Fig. 75. Aunque se pueda apreciar una aparente normalización de estas diferencias en la Fig. 76, cuando el peso del hígado se corrige por el peso corporal, las diferencias entre los grupos PE-L y PE-10E-L frente al grupo O-L siguen siendo significativas. Hay que recordar que en el experimento anterior la diferencia en el peso relativo del hígado entre el grupo de crías cuyas madres tomaban la dieta de aceite de oliva frente a las del aceite de pescado no era significativa (Fig. 56), pero en este caso, con valores muy similares, la adición de nuevos grupos lleva a que la significatividad de la diferencia sea distinta.



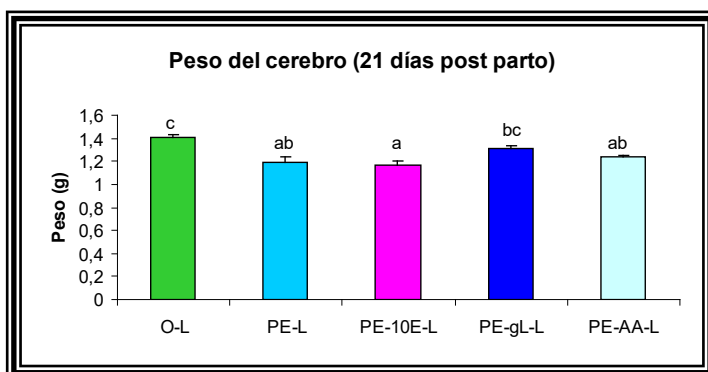
**Fig. 75:** Peso del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 76:** Peso relativo del hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).



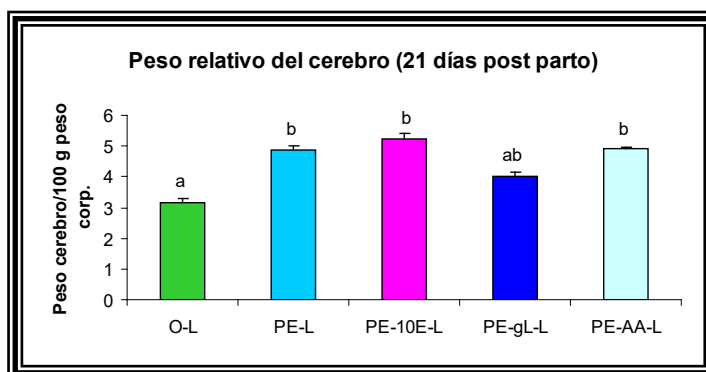
En el caso del peso absoluto del cerebro se vuelve a observar que, aunque las diferencias no sean muy grandes, el grupo de crías O-L presenta un peso significativamente mayor que el resto de grupos de crías cuyas madres estaban alimentadas con dietas basadas en aceite de pescado, excepto aquellas cuya dieta estaba suplementada con ácido  $\gamma$ -linolénico (PE-gL-L), en las que el peso del cerebro no es distinto del de las de oliva (Fig. 77 y 78).

Dado que el peso absoluto del cerebro es similar y los pesos corporales son distintos, es lógico que el peso relativo del cerebro sea inferior en las crías O-L que en el resto de grupos, aunque de nuevo la diferencia con el grupo PE-gL-L no llega a ser significativa (Fig. 78).



**Fig. 77:** Peso del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

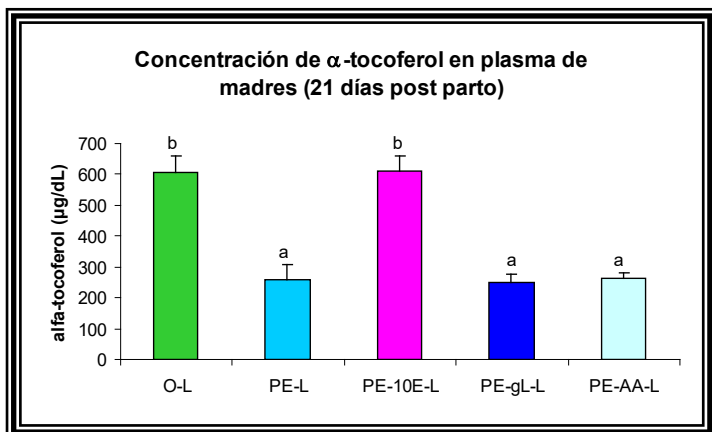
**Fig. 78:** Peso relativo del cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).



#### 4.2.3.3 $\alpha$ -Tocoferol en la lactancia

Al final de la lactancia (21 días tras el parto), se sacrificó a los animales y se analizó el contenido en  $\alpha$ -tocoferol del plasma materno, así como en plasma, hígado y cerebro de las crías.

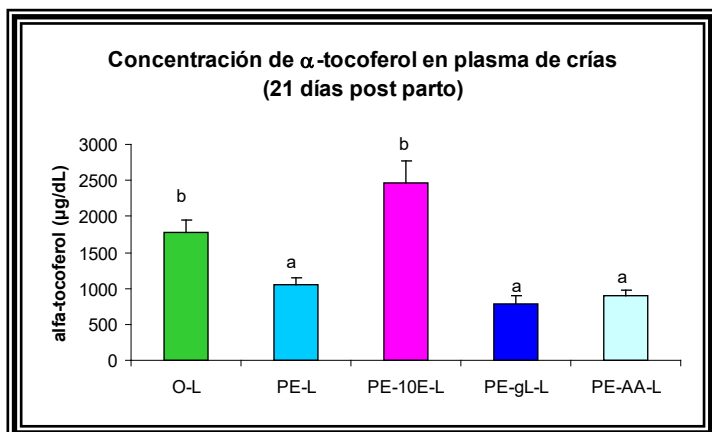
La concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en las madres durante la lactancia se presenta en la Fig. 79. En ella se puede observar que la suplementación con acetato de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta supone que los animales del grupo PE-10E-L tengan unos niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol equiparables a los de las ratas O-L. Hay que reseñar, no obstante, que en la dieta de aceite de pescado suplementada con acetato de  $\alpha$ -tocoferol había aproximadamente 10 veces la concentración de  $\alpha$ -tocoferol que tenía la dieta de aceite de pescado (Fig. 64), pero los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las ratas PE-10E-L no son 10 veces superiores a los de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de las ratas O-L. En cuanto a las otras dos suplementaciones, se observa que no afectan a los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 79) y no hay diferencias entre los grupos PE-L, PE-gL-L y PE-AA-L.



**Fig. 79:** Concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

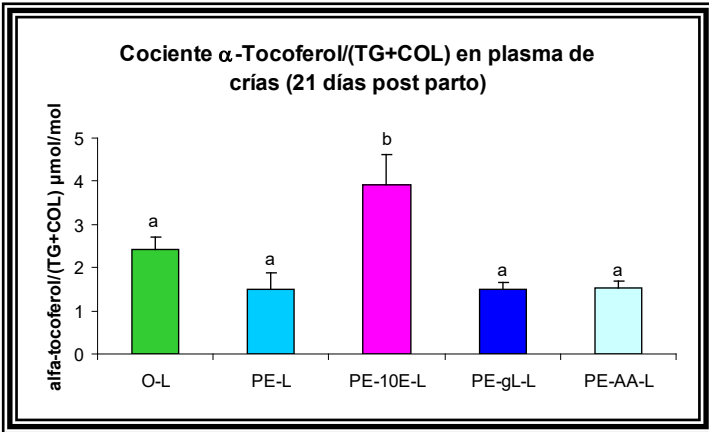
En la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las crías, representada en la Fig. 80, se observa la misma tendencia que en sus madres: Los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las crías PE-10E-L son similares a los de las crías O-L y superiores a los de los grupos cuyas madres tomaron cualquiera de las otras tres dietas basadas en el aceite de pescado.

Como puede observarse en la Fig. 80, la suplementación con acetato de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta de las madres supone que en la leche a las crías llegue más  $\alpha$ -tocoferol y que la fracción lipídica plasmática en las crías PE-10E-L esté más enriquecida en  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 81). Hay que recordar de nuevo que la diferencia en la concentración de vitamina E entre la dieta PE-10E y el resto de las dietas (Fig. 64) es muy superior a la diferencia que se observa entre los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de las crías.



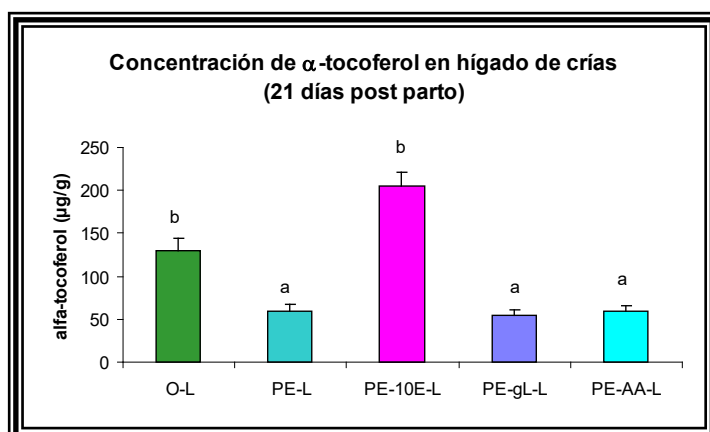
**Fig. 80:** Concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 81:** Cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma de crías cuyas madres tomaban dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).



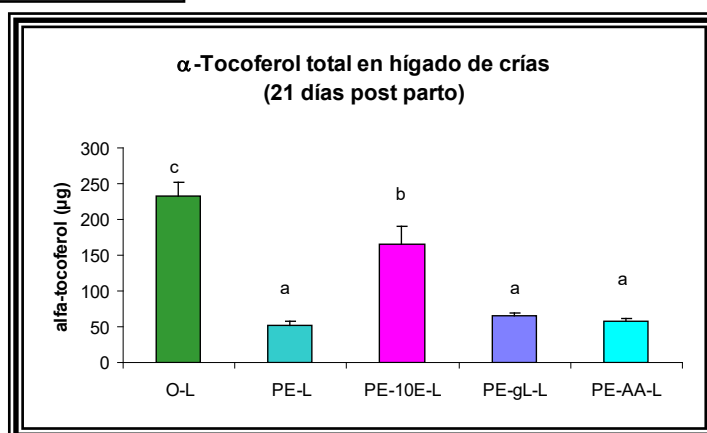


En el hígado se observa también el mismo patrón: En la Fig. 82 se puede apreciar que en los grupos PE-L, PE-gL-L y PE-AA-L la concentración hepática de  $\alpha$ -tocoferol es semejante y más baja que en los grupos O-L y PE-10E-L. La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de las crías cuyas madres tomaron la dieta de pescado suplementada con acetato de  $\alpha$ -tocoferol (PE-10E-L) es incluso superior (pero no significativamente) a la de las crías O-L, pero si se estima la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol teniendo en cuenta el peso del hígado (Fig. 83) se invierte la relación que se observaba en la concentración, siendo la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en hígado superior en el caso de las crías O-L que en las PE-10E-L.

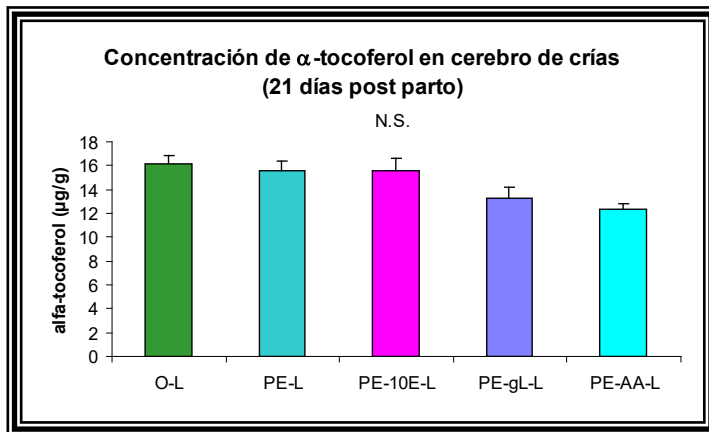


**Fig. 82:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 83:**  $\alpha$ -tocoferol total en hígado de crías cuyas madres tomaban dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).



A pesar de esas diferencias entre los grupos en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro es mucho más estable. Así, como se observa en la Fig. 84, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro es igual en todos los grupos, sin diferencias entre ellas.



**Fig. 84:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva, de pescado, o de pescado suplementado con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolénico o ácido araquidónico. Letras iguales indican grupos homogéneos ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.4 Experimento 4: Intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes

El retraso observado en las crías cuyas madres tomaban las dietas basadas en aceite de pescado podía ser consecuencia de la ingestión de dicha dieta bien durante la gestación, bien durante la lactancia. Para determinar si el retraso era consecuencia de la ingesta en una etapa o en otra, se diseñó un experimento en el que las crías cambiaban de madre, de manera que crías procedentes de una madre que hubiera ingerido una determinada dieta durante la gestación lactaban de una madre cuya dieta fuera diferente. A estas madres de las que lactaban las crías se hará referencia en el texto como nodrizas. Tomando como referencia la dieta con aceite de oliva (10%), se organizaron cuatro grupos de crías: OG-PEL, crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de oliva durante la gestación, cambiadas a nodrizas recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de pescado; OG-OL: crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de oliva durante la gestación, cambiadas a nodrizas recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de oliva; PEG-OL, crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de pescado durante la gestación, cambiadas a nodrizas recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de oliva; PEG-PEL, crías nacidas de madres que habían tomado la dieta de aceite de pescado durante la gestación, cambiadas a nodrizas recién paridas que estaban tomando la dieta de aceite de pescado.

Para tener en cuenta los efectos que pudiera tener el cruce tanto sobre las madres como sobre las crías, se realizaron cruces incluso con las crías que pasaron a lactar de nodrizas que ingerían la misma dieta que su correspondiente madre durante la gestación.

Dado que las dietas se prepararon de la misma forma que en los experimentos anteriores, su contenido en vitamina E fue igual al previamente medido, que fue representado en las Figs. 30 y 64.

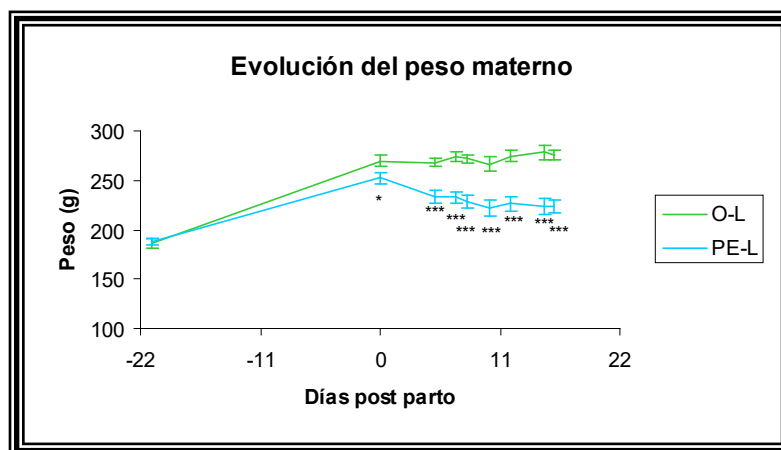
Como las madres no cambiaban de dieta tras el parto, se consideró que no había más que dos grupos de madres: las que tomaban la dieta de oliva y las que tomaban la de pescado (O-L y PE-L, respectivamente). Por tanto, todas las comparaciones estadísticas referidas a las madres se hicieron dos a dos, contrastando la hipótesis de la igualdad de medias mediante la *t* de Student, tras comprobar la homogeneidad de varianzas. Cuando las diferencias resultaron ser significativas ( $P > 95\%$ ), se indica en las respectivas figuras mediante asteriscos: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Cuando se deseó comparar los datos correspondientes a los cuatro grupos de crías, tras un ANOVA de una vía, se compararon las medias mediante el test de Student-Newman-Keuls, considerándose significativas las diferencias con un 95% de confianza.

#### 4.2.4.1 Parámetros maternos

La ingesta de las nodrizas fue estimada de la misma forma que en el experimento anterior, y, al igual que se representa en la Fig. 66, se encontró que no había diferencias significativas entre la ingesta de ambos grupos.

A pesar de no existir diferencias significativas en el peso de las madres al inicio de la gestación (Fig. 85) el peso de las madres que ingerían la dieta conteniendo aceite de oliva durante la gestación y lactancia es significativamente superior a partir del día del parto que el de las madres alimentadas con una dieta con aceite de pescado (Fig. 85).

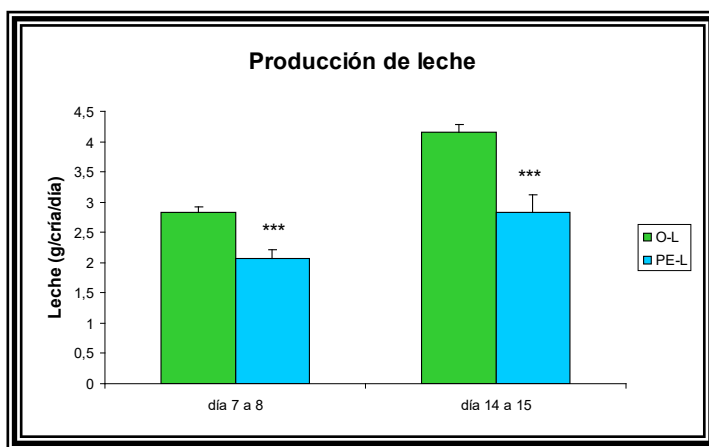


**Fig. 85:** Peso corporal durante la lactancia de las ratas alimentadas durante la gestación y la lactancia con la dieta de aceite de oliva (O-L) o de pescado (PE-L). O-L vs PE-L \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

#### 4.2.4.1.1 Producción y composición de la leche

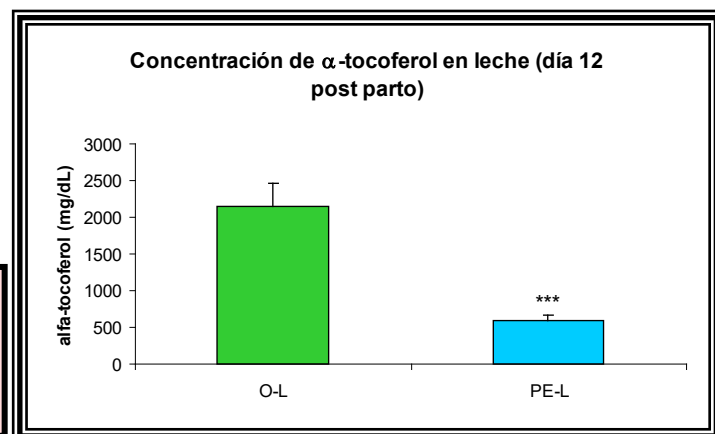
Las diferencias encontradas en los experimentos anteriores en cuanto a la composición del plasma y tejidos maternos en función de las dietas ingeridas nos llevaron a pensar que podría estar modificada la composición de la leche por ellas secretada, así como la cantidad de leche producida.

Por ello se estimó la producción de leche en dos días distintos de la lactancia. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.1.2.3 del capítulo de Materiales y Métodos de la presente Memoria. Como se puede observar en la Fig. 86, se encontró que las madres alimentadas con la dieta de aceite pescado producen menos leche que las de oliva en los dos días.



**Fig. 86:** Producción de leche. Ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado.

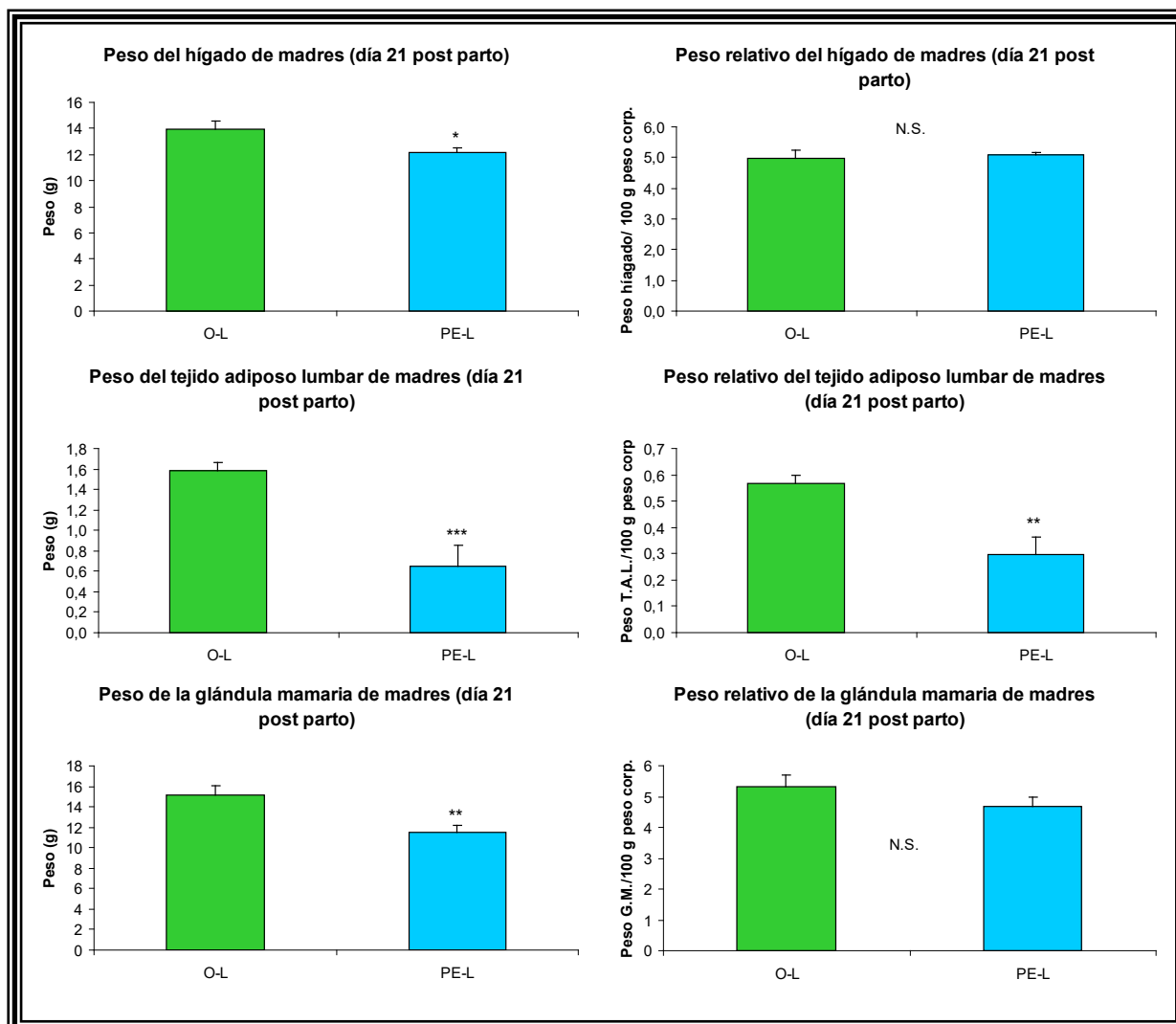
A su vez, en el día 12 tras el parto se obtuvo una muestra de leche de todas las madres y se cuantificó en ella la concentración de  $\alpha$ -tocoferol. En la Fig. 87 se puede observar que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la leche de madres que están tomando la dieta de pescado es mucho menor que en la leche de las madres que ingieren la dieta de oliva.



**Fig. 87:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la leche de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L, \*\*\*,  $p < 0.001$

Así pues, la suma de estos dos factores, la menor producción de leche y la menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol en ésta, nos lleva a la conclusión de que las crías de madres PE-L ingieren mucho menos  $\alpha$ -tocoferol que las de las ratas O-L.

## 4.2.4.1.2 Parámetros corporales



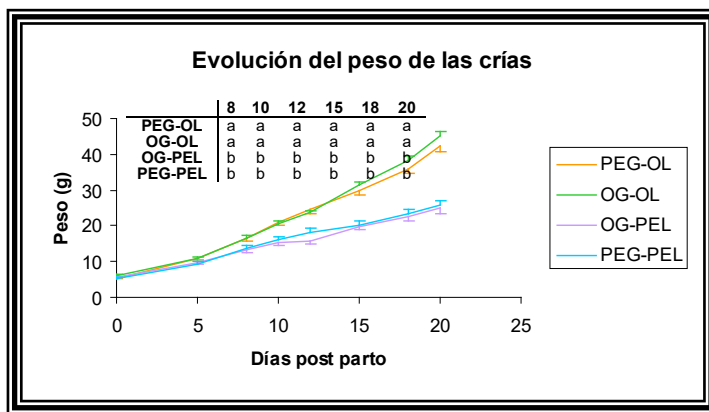
**Fig. 88:** Pesos y pesos relativos de hígado, tejido adiposo lumbar y glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L ; N.S., no significativo; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

En el día 21 de la lactancia las madres alimentadas con la dieta conteniendo aceite de oliva presentan mayores pesos del tejido adiposo lumbar, hígado y glándula mamaria que las alimentadas con la dieta de aceite de pescado (Fig. 88). El menor tamaño del hígado y de la glándula mamaria de estas ratas a dieta de aceite de pescado está directamente relacionado con el menor tamaño corporal, pues, como se representa en la Fig. 88, el peso relativo de ambos órganos no varía en función de la dieta. Sin embargo, el peso de tejido adiposo lumbar en las ratas que toman la dieta de pescado es mucho más pequeño que el de las de oliva, de ma-

nera que también el peso relativo de este órgano en las ratas PE-L es menor que el de las O-L (Fig. 88).

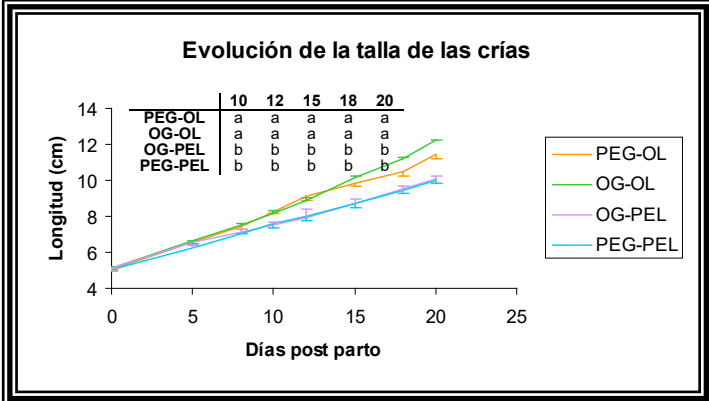
#### 4.2.4.2 Desarrollo tras el nacimiento

Como se muestra en las Figs. 89 y 90, tanto el peso corporal como la talla fueron menores en las crías lactadas por nodrizas alimentadas con dieta de pescado durante la lactancia (PEG-PEL y OG-PEL), que la de crías lactadas por nodrizas alimentadas con dieta de oliva (OG-OL y PEG-OL), en ambos casos de forma independiente de la dieta que habían ingerido sus respectivas madres durante la gestación. Es decir, que las crías PEG-PEL y OG-PEL presentan peso y talla significativamente menores que las crías OG-OL y PEG-OL desde el día 8 (peso) y desde el día 10 (talla) tras el parto, haciéndose las diferencias más importantes a medida que avanza la lactancia, hasta el final de la misma (Figs. 89 y 90)

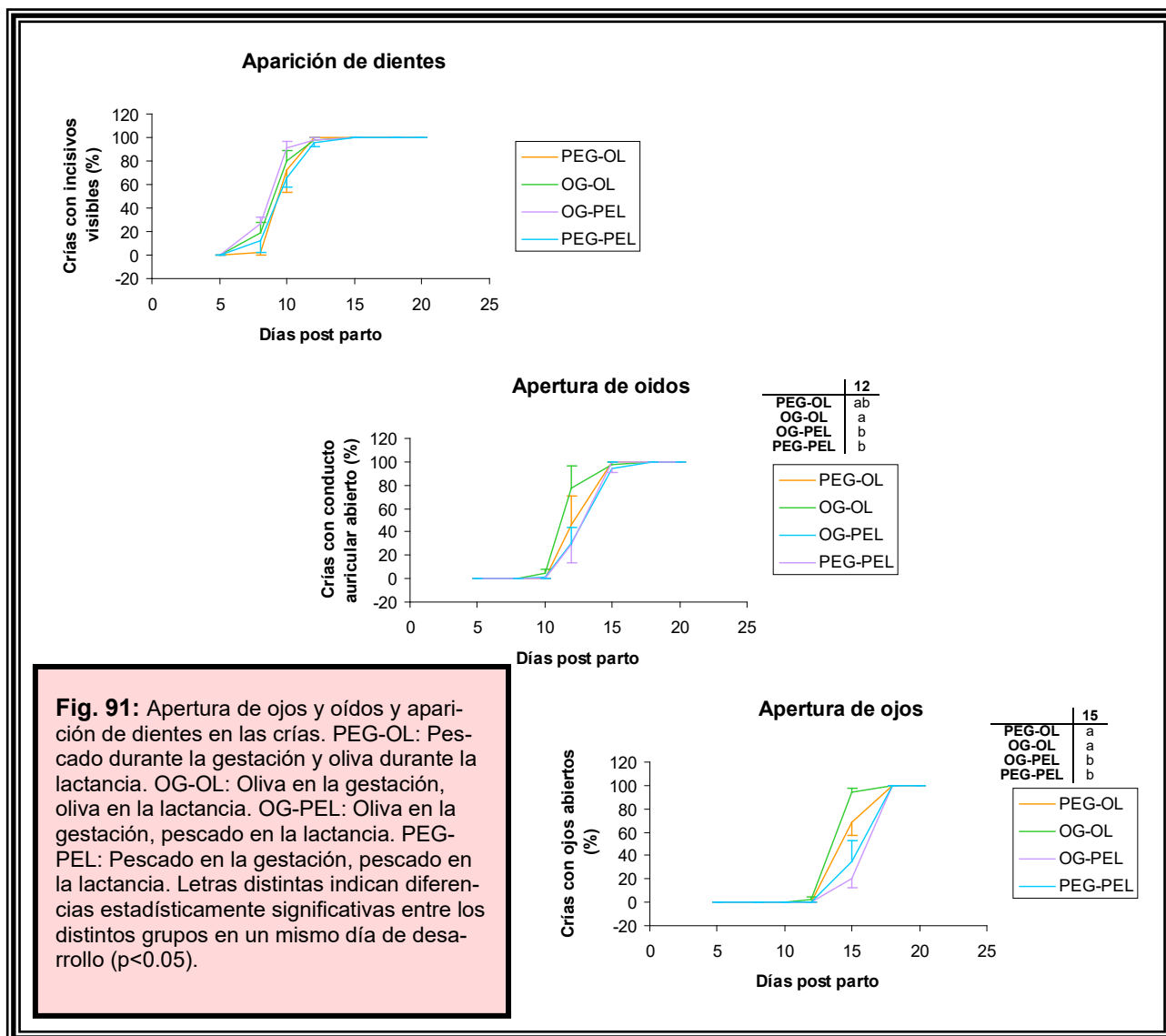


**Fig. 89:** Evolución postnatal del peso de crías. PEG-OL: Crías de madres que durante la gestación tomaron la dieta de pescado y lactadas por nodrizas que tomaban la dieta de oliva. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en un mismo día de desarrollo ( $p < 0.05$ ).

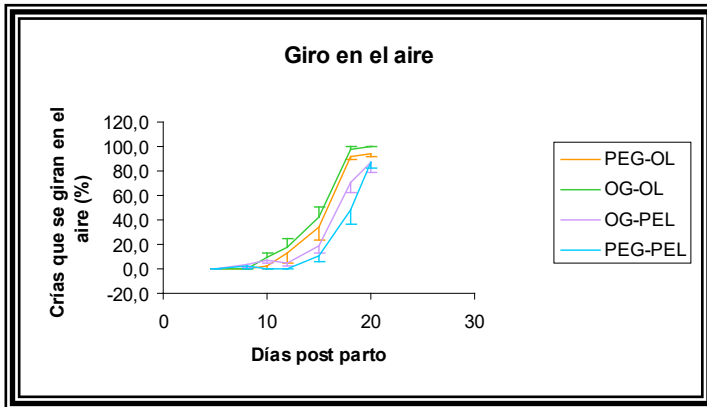
**Fig. 90:** Evolución postnatal de la talla de crías. PEG-OL: Crías de madres que durante la gestación tomaron la dieta de pescado y lactadas por nodrizas que tomaban la dieta de oliva. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en un mismo día de desarrollo ( $p < 0.05$ ).



Como se puede observar en la Fig. 91, a día 12 de lactancia un mayor porcentaje de crías de las camadas OG-OL y PEG-OL presentan abiertos los ojos y el conducto auditivo frente a las camadas PEG-PEL y OG-PEL. Además, aunque no se producen diferencias estadísticamente significativas, la aparición de dientes en las crías PEG-PEL y OG-PEL tiene lugar ligeramente más tarde que en las crías OG-OL y PEG-OL (Fig. 91).

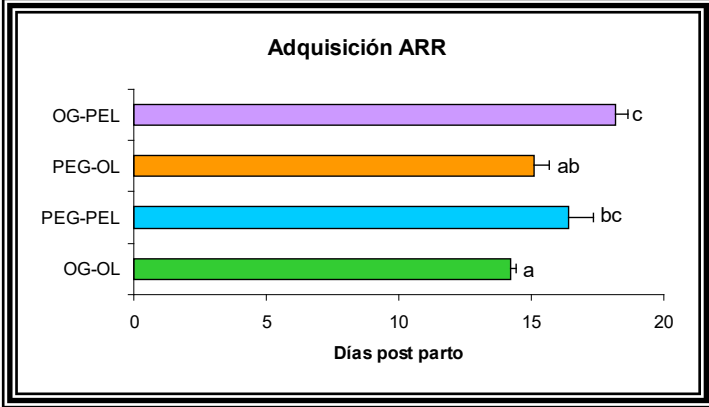


En cuanto a la evaluación de los reflejos indicativos del desarrollo psicomotor, en la Fig. 92 se representa el porcentaje de crías que se giraban en el aire en un día determinado. En la Fig. 93 se observa que el día en el que se estima que la mitad de las crías han adquirido esta capacidad ( $I_{50}$ ) es anterior cuando la dieta de las nodrizas es la de oliva. Así, estos dos grupos (OG-OL y PEG-OL) adquieren antes este reflejo que los dos grupos cuyas nodrizas tomaban la dieta de pescado (PEG-PEL y OG-PEL). Entre grupos cuyas nodrizas tomaban la misma dieta, las diferencias no son significativas y tampoco lo es la diferencia entre el  $I_{50}$  de los grupos PEG-OL y de PEG-PEL (Fig. 93)

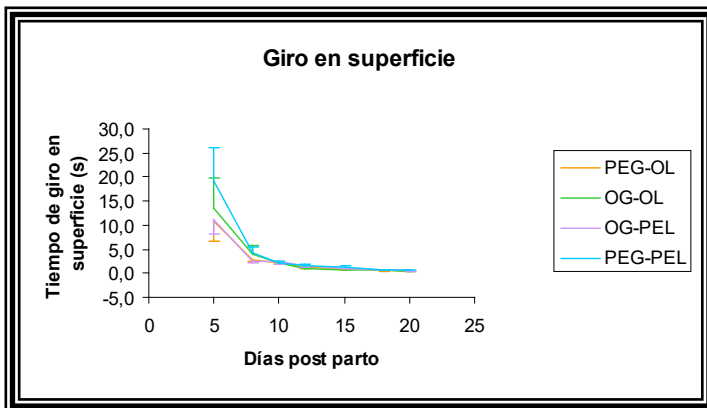


**Fig. 92:** Adquisición del reflejo de giro en el aire de crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia.

**Fig. 93:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en el aire. Crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).



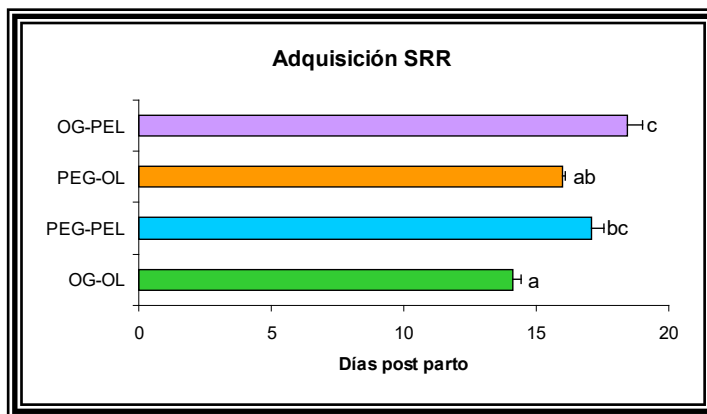
Se estudió también el tiempo que tardaban en girarse las crías y los resultados se representan en la Fig. 94. En la Fig. 95 se muestran los datos del día en que la mitad de la camada es capaz de girarse en menos de un segundo. En ella se observa también que las crías que lactan de nodrizas que toman la dieta de oliva adquieren esta capacidad antes que las que lactan de nodrizas de pescado, aunque la diferencia entre el grupo PEG-OL y el PEG-PEL no es significativa.



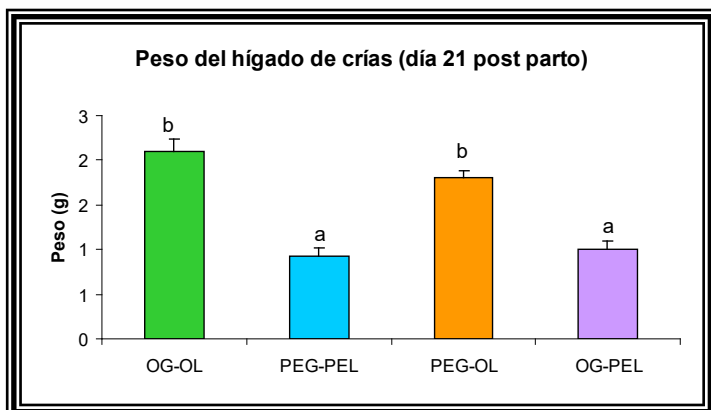
**Fig. 94:** Tiempo de giro en superficie de crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia.



**Fig. 95:** Día en el que la mitad de la camada adquiere el reflejo de giro en superficie. Crías de ratas intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).

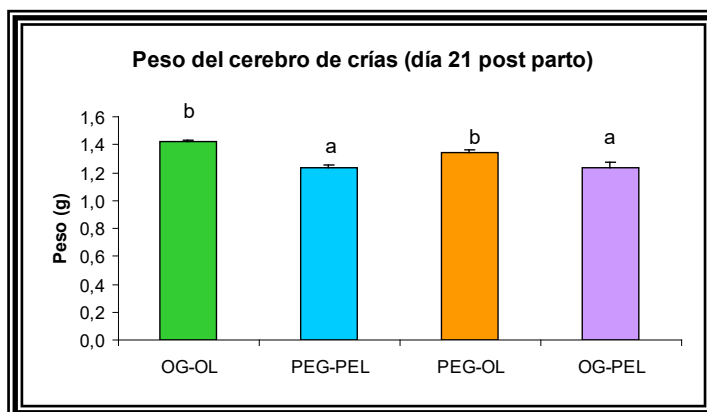


Además de la disminución en el peso y tamaño corporal observada en las crías PEG-PEL y OG-PEL, también tiene lugar en estas mismas crías una disminución del peso del hígado y cerebro a día 21 de lactancia (Figs. 96 y 97).



**Fig. 96:** Peso del hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).

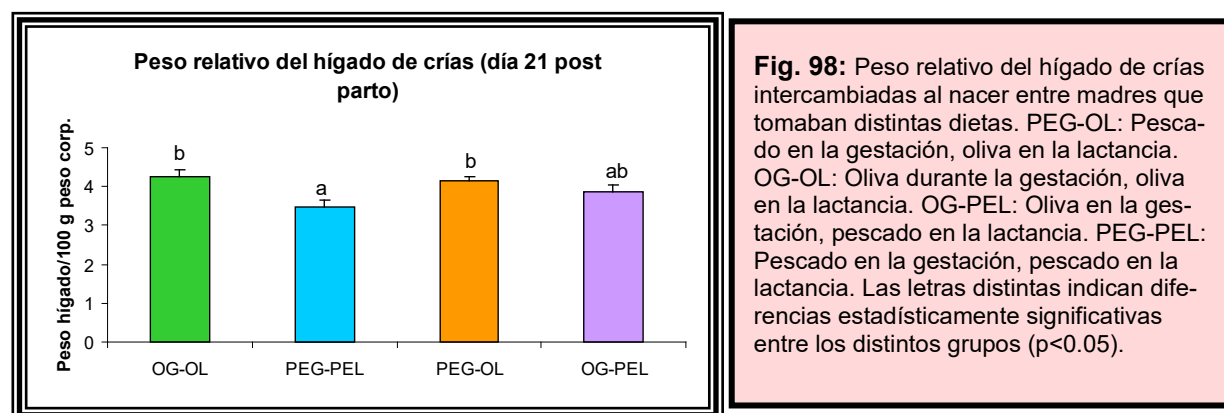
**Fig. 97:** Peso del cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).



Como se observa en la Fig. 98, el tamaño relativo del hígado de las crías PEG-PEL es inferior al de los otros tres grupos, entre los que no hay diferencias significativas.

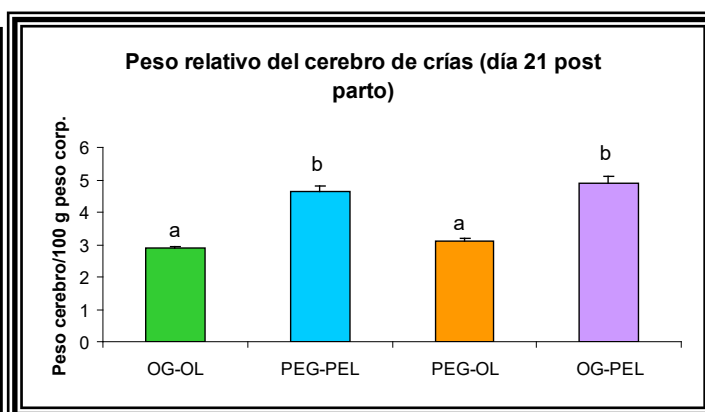
En el caso del peso relativo del cerebro, representado en la Fig. 99, por un lado, no se aprecian diferencias entre los dos grupos de crías cuyas nodrizas tomaban la dieta de oliva (OG-OL y PEG-OL) y por el otro, tampoco se observan diferencias entre los dos grupos cuyas nodrizas

tomaban la dieta de pescado (PEG-PEL y OG-PEL) y que presentan un peso relativo del cerebro mayor que los otros dos (Fig. 99).



**Fig. 98:** Peso relativo del hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 99:** Peso relativo del cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).



#### 4.2.4.3 $\alpha$ -Tocoferol en la lactancia

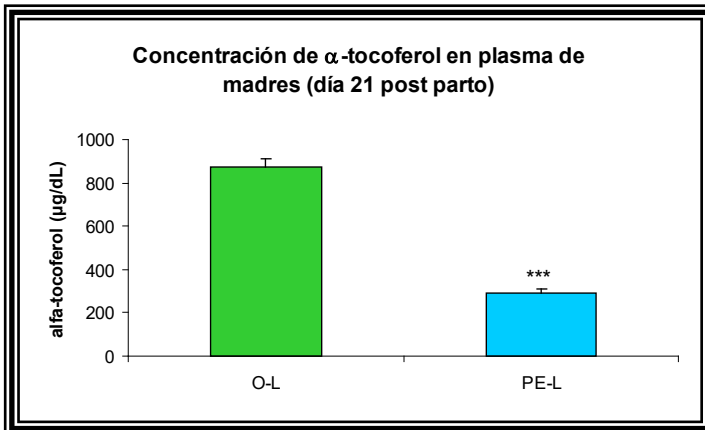
Al final de la lactancia, a los 21 días tras el parto, se sacrificó a los animales y se analizó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma, hígado, tejido adiposo lumbar y glándula mamaria de las madres y en el plasma, hígado y cerebro de las crías.

##### 4.2.4.3.1 $\alpha$ -Tocoferol en tejidos maternos

En el plasma de las ratas alimentadas con la dieta de pescado (ratas PE-L) se observa de nuevo una menor concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol que las alimentadas con aceite de oliva (ratas O-L) (Fig. 100). El cociente entre  $\alpha$ -tocoferol y el conjunto de triglicéridos más colesterol (Fig. 101) es también menor en las ratas PE-L al final de la lactancia (21 días tras el parto), al igual que ocurría con las ratas vírgenes y gestantes que habían tomado la dieta de aceite de pescado durante 20 días (Figs. 32 y 43).

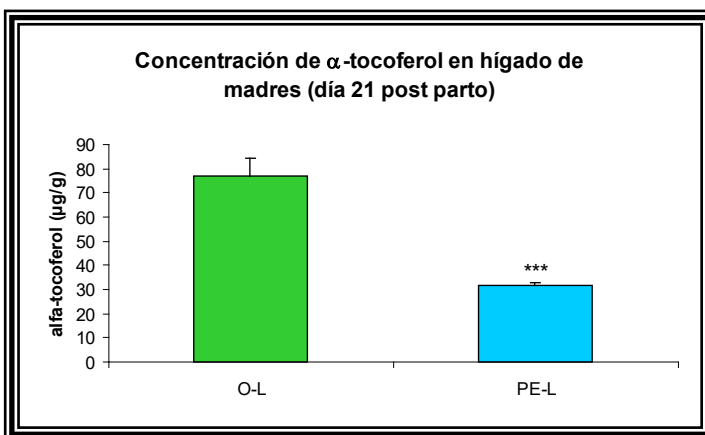
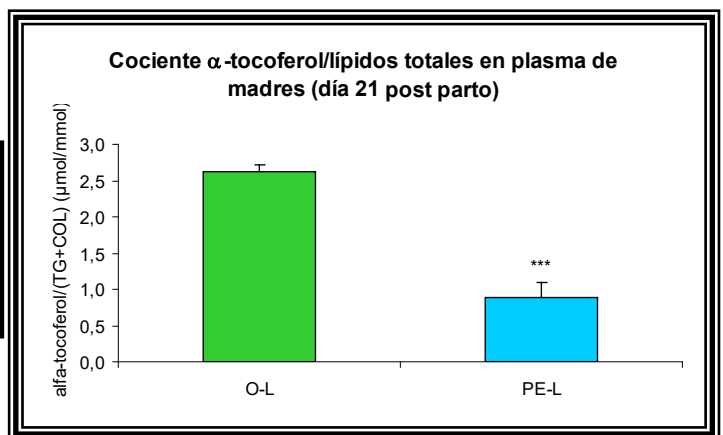
En la Fig. 102 se observa que también en el hígado de las ratas alimentadas con la dieta de oliva (O-L) la concentración de  $\alpha$ -tocoferol es superior a la de las ratas PE-L. En consecuencia,

la cantidad estimada de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado en las ratas O-L es también mayor que en las PE-L (Fig. 103).



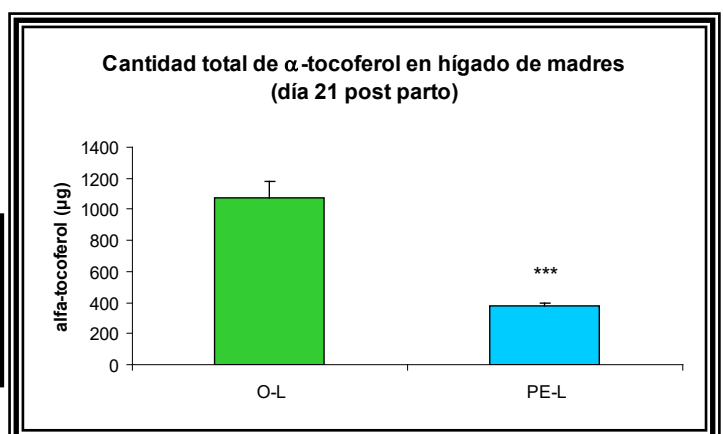
**Fig. 100:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$

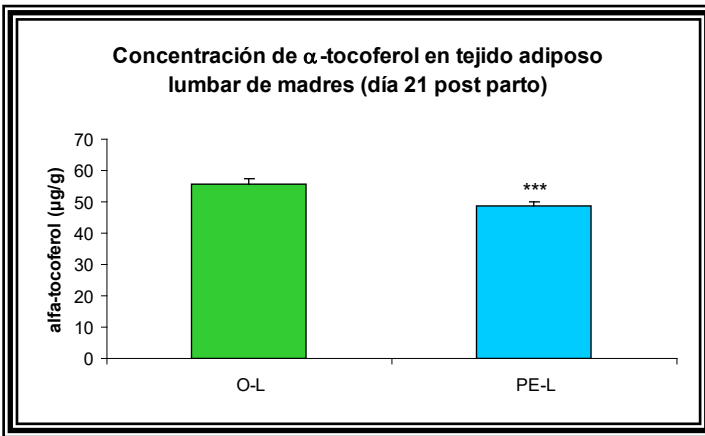
**Fig. 101:** Cociente  $\alpha$ -tocoferol / (triglicéridos + colesterol) en el plasma de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$



**Fig. 102:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$

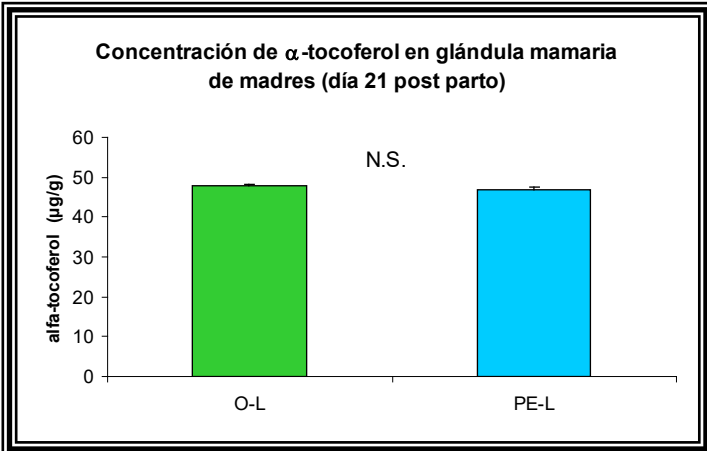
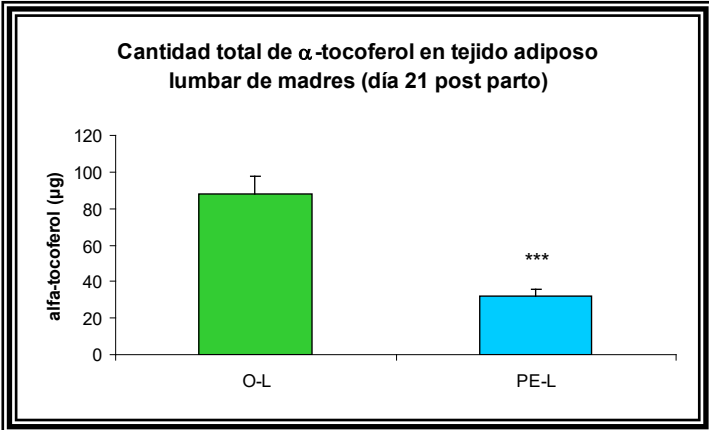
**Fig. 103:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$





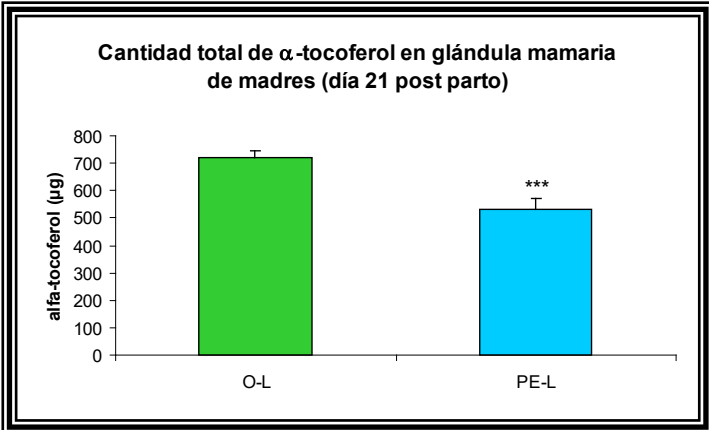
**Fig. 104:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo lumbar de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$

**Fig. 105:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo lumbar de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$



**Fig. 106:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$

**Fig. 107:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria de ratas alimentadas con dietas con un 10% de aceite de oliva o de pescado. O-L vs PE-L; \*\*\*,  $p < 0.001$



En la Fig. 104 se observa que aunque la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo es ligeramente inferior en el grupo PE-L que en el O-L, la diferencia es altamente significativa. De hecho, la diferencia entre los dos grupos es aún más acusada al estimar la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo (Fig. 105).

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria (Fig. 106) es del mismo orden de magnitud que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo (Fig. 104) y no hay diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, al estimar la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria (Fig. 107) sí se observa que, aunque los valores son próximos, la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria de las ratas O-L es superior a la de las PE-L.

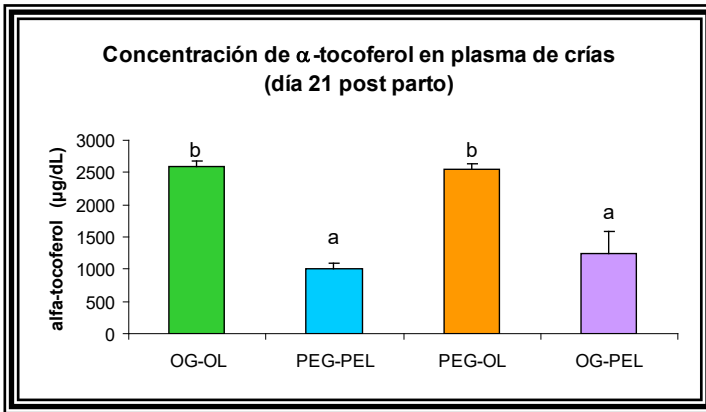
#### **4.2.4.3.2 $\alpha$ -Tocoferol en tejidos de las crías**

En la Fig. 108 se observa que no hay diferencias en los valores de aquellos grupos cuyas nodrizas tomaron la misma dieta (OG-OL y PEG-OL frente a OG-PEL y PEG-PEL). Además, cuando las crías han lactado de nodrizas alimentadas con la dieta de pescado (PEG-PEL y OG-PEL), la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma es menor que en las crías que lactaban de nodrizas que tomaban la dieta de oliva (OG-OL y PEG-OL, Fig. 108).

En la Fig. 109 se muestra el cociente de la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol y los lípidos plasmáticos (triglicéridos más colesterol) y se observa que su valor sigue siendo más alto en los grupos OG-OL y PEG-OL, que en los PEG-PEL y OG-PEL. Las diferencias observadas en estos cocientes son ligeramente inferiores que en la concentración absoluta de  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 108), pero la comparación estadística entre los grupos da el mismo resultado en ambos parámetros.

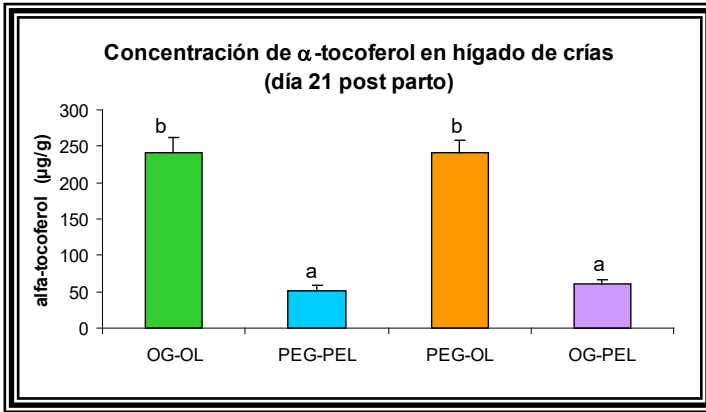
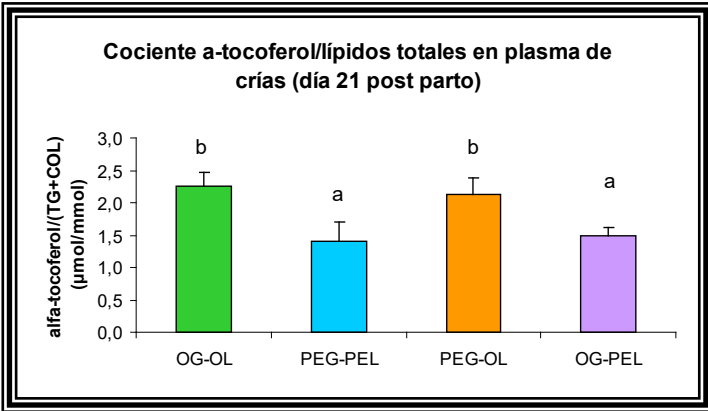
En las Figs. 110 y 111 se muestra la concentración y la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de las crías de los distintos grupos experimentales, que siguen el mismo patrón de distribución que en el plasma: tanto la concentración como la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol son superiores en los hígados de las crías que lactan de nodrizas que están tomando la dieta de oliva que en las crías que lactan de las nodrizas alimentadas con la dieta de aceite de pescado.

A pesar de esas diferencias entre los grupos en los valores de  $\alpha$ -tocoferol en plasma e hígado, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro de las crías es muy semejante en todos los grupos (Fig. 112), sin que se observen diferencias significativas entre ninguno de los cuatro.



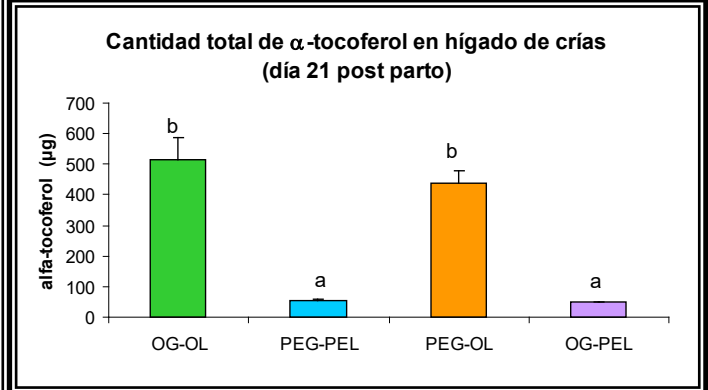
**Fig. 108:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).

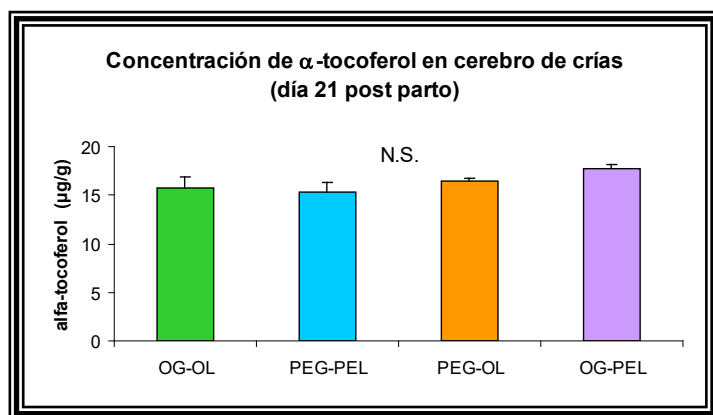
**Fig. 109:** Cociente  $\alpha$ -tocoferol/(triglicéridos + colesterol) en plasma de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 110:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 111:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ( $p < 0.05$ ).





**Fig. 112:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en cerebro de crías intercambiadas al nacer entre madres que tomaban distintas dietas. PEG-OL: Pescado en la gestación, oliva en la lactancia. OG-OL: Oliva durante la gestación, oliva en la lactancia. OG-PEL: Oliva en la gestación, pescado en la lactancia. PEG-PEL: Pescado en la gestación, pescado en la lactancia. N.S.: No Significativo

En resumen, este conjunto de resultados pone de manifiesto la importante influencia que tiene la dieta de la madre lactante sobre la disponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol en la leche y consecuentemente en las crías. Esta influencia es muy superior a la producida por la ingesta de la madre durante la gestación, ya que las crías procedentes de madres que durante la gestación estaban alimentadas con dieta de aceite de pescado, lograban normalizar sus niveles de  $\alpha$ -tocoferol al ser lactadas por nodrizas alimentadas con dieta de aceite de oliva. Debemos también comentar que la menor llegada de  $\alpha$ -tocoferol a las crías lactadas por nodrizas alimentadas con dieta de aceite de pescado no era sólo el resultado de su menor concentración en la leche, sino también de la menor producción de leche que se observaba en dichas nodrizas. Cabría también pensarse que esa menor producción de leche en las nodrizas alimentadas con la dieta de aceite de pescado fuera consecuencia de una menor ingesta, como podría sugerirlo el menor peso corporal de estos animales (Fig. 89). Sin embargo, ya vimos cómo la ingesta de las ratas alimentadas con dieta de pescado no difería de la de las ratas a dieta de oliva, por lo que tanto el menor peso corporal como la menor producción de leche deben ser consecuencia directa de dicha dieta de pescado sobre estos parámetros.

#### 4.2.5 Experimento 5: Destino del $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E.

En todos los experimentos anteriores fue común el que los niveles o la concentración de  $\alpha$ -tocoferol fuera siempre menor cuando los animales ingerían una dieta basada en el aceite de pescado. Una posible explicación de esta disminución era que una dieta rica en PUFA aumentara la peroxidación lipídica, y, consecuentemente, aumentara el consumo de  $\alpha$ -tocoferol. Realizamos entonces un experimento para conocer si la oxidación de  $\alpha$ -tocoferol estaba aumentada en ratas que hubieran tomado durante tres semanas la dieta de aceite de pescado, comparada con otra dieta rica también en PUFA como la de girasol, tomando como referencia animales que ingerían la dieta de oliva. Todas las dietas fueron suplementadas con la misma canti-

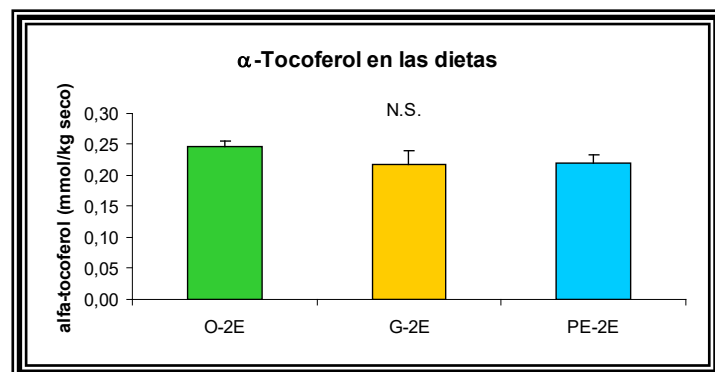
dad de acetato de  $\alpha$ -tocoferol. Para determinar el efecto de un incremento en el estrés oxidativo aumentado, parte de los animales que tomaban cada dieta fueron hechos diabéticos mediante la administración de estreptozotocina. A diferencia de los experimentos anteriores, en este todos fueron ratas macho.

Los resultados se han analizado considerando dos factores (tipo de dieta y diabetes). A su vez, parte del experimento se realizó con los animales en ayunas, por lo que cuando se analizaron los resultados antes y después del ayuno, se consideraron tres factores (ayuno, tipo de dieta y diabetes). Tras el ANOVA de dos o tres vías correspondiente, en los que se consideraban todas las posibilidades de interacción entre factores, se compararon las medias de los grupos mediante el test LSD (*Least Significant Difference*). A los principales resultados de estos análisis estadísticos se hace referencia sólo en el texto. Además se ha realizado en todo los casos un ANOVA de una vía y la posterior comparación de medias mediante el test LSD y los resultados de esa comparación son los que se muestran en las figuras mediante letras que indican la homogeneidad de medias.

#### 4.2.5.1 $\alpha$ -Tocoferol en las dietas

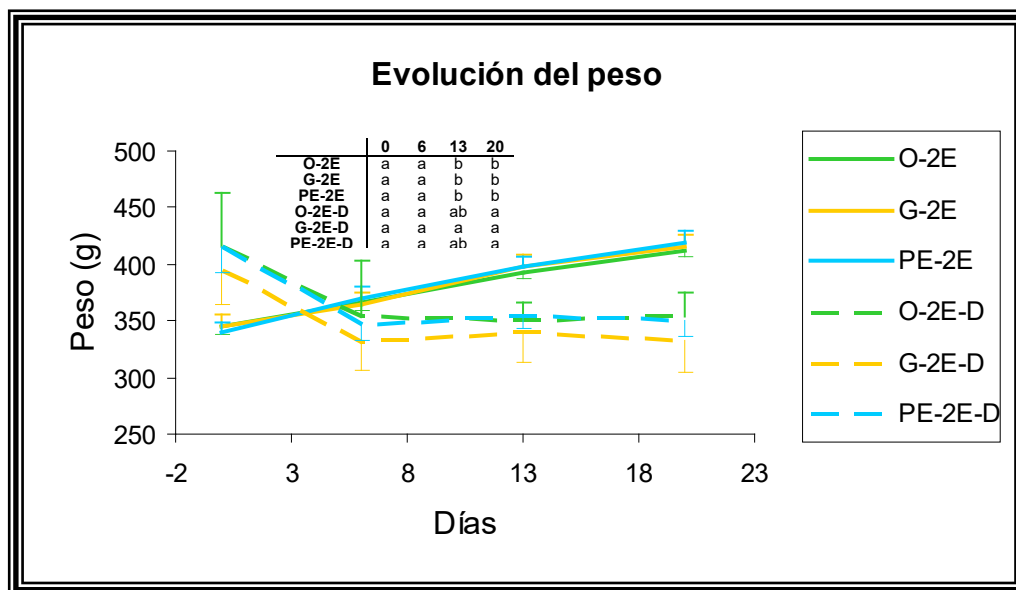
Para conseguir que los animales tuvieran a su disposición una cantidad alta y uniforme de vitamina E, se suplementaron las dietas con acetato de  $\alpha$ -tocoferol (el doble de la cantidad habitual) y cuando se analizó la concentración total de  $\alpha$ -tocoferol en las dietas se obtuvieron los resultados que se observan en la Fig. 113: ningún valor es significativamente diferente de los otros.

**Fig. 113:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en las dietas empleadas en el Experimento 5. Los datos se presentan en forma de media  $\pm$  SEM. N.S., No Significativo.





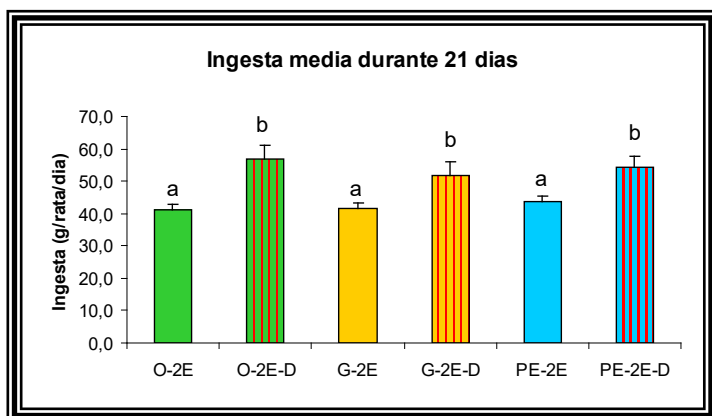
## 4.2.5.2 Ingesta y peso corporal



**Fig. 114:** Evolución del peso corporal de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas O-2E: Ratas controles que tomaron durante 20 días la dieta de aceite de oliva suplementada con vitamina E; O-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta O-2E; G-2E: Ratas que tomaron durante 20 días la dieta de aceite de girasol suplementada con vitamina E; G-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta G-2E; PE-2E: Ratas que tomaron durante 20 días la dieta de aceite de pescado suplementada con vitamina E; PE-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta PE-2E. Los datos se presentan en forma de media $\pm$ SEM. Letras iguales indican medias homogéneas dentro de cada día.

En la Fig. 114 se observa que durante las tres semanas que los animales estuvieron tomando las respectivas dietas, los animales diabéticos no aumentaron su peso, mientras que los controles incrementaron su peso de manera constante. De esta forma, a día 13 las diferencias de peso empezaron a ser significativas entre los animales diabéticos y los controles, a pesar de que el peso de los diabéticos que tomaban la dieta de oliva (O-2E-D) y los diabéticos que tomaban la dieta de pescado (PE-2E-D) era homogéneo con el de los controles. En el día 20, se aprecia claramente que, independientemente del tipo de dieta, los pesos de los animales diabéticos eran menores que los de los controles. A lo largo de las tres semanas, en ningún momento hubo diferencias dependiendo de las dietas; es decir, los pesos de los tres grupos controles fueron iguales entre sí y los pesos de los tres grupos de diabéticos fueron iguales entre sí, en todos los días estudiados.

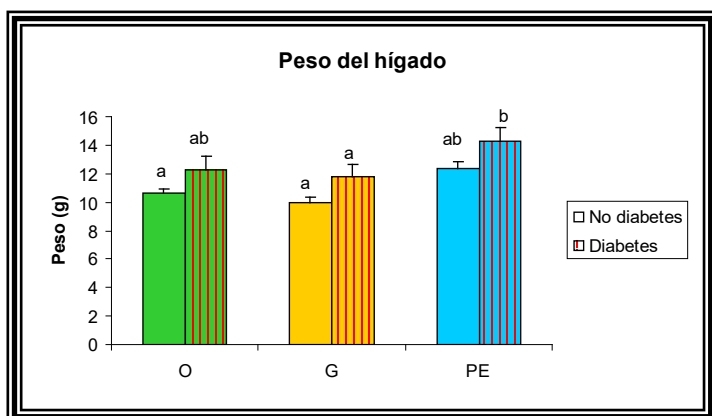
En la Fig. 115 se presentan los valores estimados de la ingesta media a lo largo de las tres semanas de estudio. Se puede apreciar que no hay diferencias debidas al tipo de dieta y que los tres grupos de animales diabéticos presentan la conocida hiperfagia con relación a las ratas controles.



**Fig. 115:** Ingesta media de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas O-2E: Ratas controles que tomaron durante 20 días la dieta de aceite de oliva suplementada con vitamina E; O-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta O-2E; G-2E: Ratas que tomaron durante 20 días la dieta de aceite de girasol suplementada con vitamina E; G-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta G-2E; PE-2E: Ratas que tomaron durante 20 la dieta de aceite de pescado suplementada con vitamina E; PE-2E-D: Ratas diabéticas que tomaron durante 20 días la dieta PE-2E. Letras iguales indican medias homogéneas.

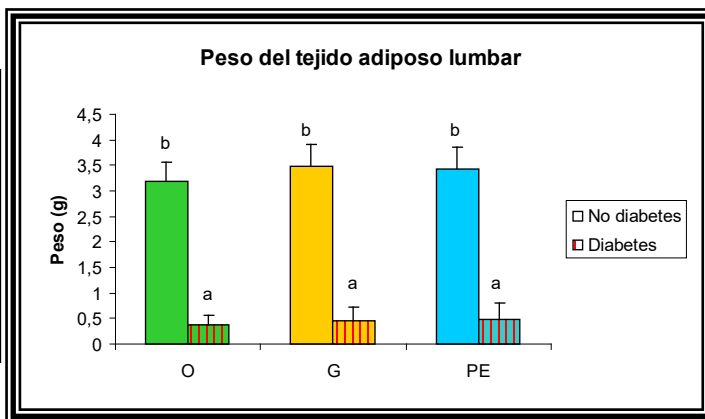
Durante las últimas 24 h del experimento los animales se mantuvieron en ayunas, con el propósito de determinar la desaparición del  $\alpha$ -tocoferol, la aparición de los productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol y la excreción de isoprostanos en la orina. Al tiempo del sacrificio se extrajeron el hígado y el tejido adiposo lumbar, que fueron pesados. Se puede apreciar (Fig. 116) que los animales diabéticos tienen un hígado ligeramente mayor que los controles. Además, no hay diferencias entre los valores de los grupos de oliva y girasol, pero los animales alimentados con la dieta de pescado presentan un mayor peso hepático que los de las otras dos dietas. No existe evidencia estadística de interacción entre la dieta de pescado y la diabetes, por lo que se puede considerar que cada uno de los dos factores ejerce su influencia por separado sobre el tamaño del hígado.

Los pesos medios de los tejidos adiposos se presentan en la Fig. 117 y se puede apreciar que no hay diferencias significativas debidas al tipo de dieta, pero que la diabetes hace que la cantidad de tejido adiposo lumbar disminuya hasta incluso desaparecer en algunos casos. En este sentido hay que reseñar que hubo tres animales diabéticos (uno del grupo G-2E-D y dos del PE-2E-D) que no tenían nada de tejido adiposo lumbar.



**Fig. 116:** Peso del hígado en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E). Letras iguales indican medias homogéneas.

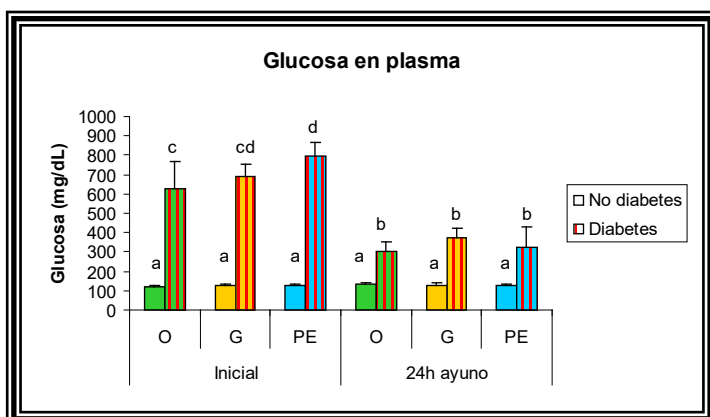
**Fig. 117:** Peso del tejido adiposo lumbar en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E). Letras iguales indican medias homogéneas



#### 4.2.5.3 Parámetros plasmáticos antes y después del ayuno

De la sangre obtenida al inicio y al final de las 24h de ayuno se separó el plasma, en el que se determinaron distintos parámetros.

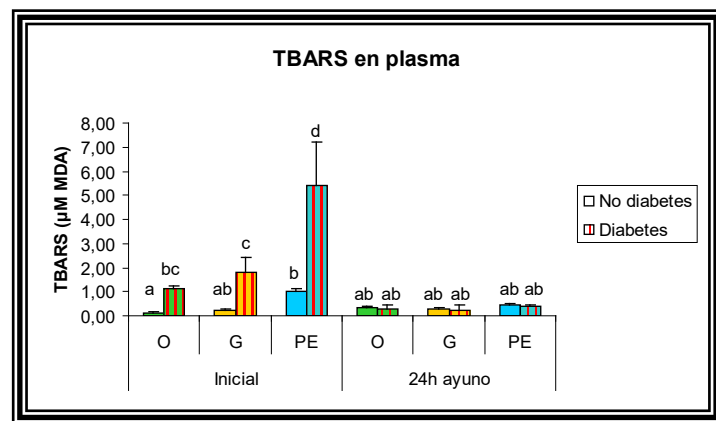
Se midió en el plasma la concentración de glucosa, que se presenta en la Fig. 118. De manera global, el tipo de dieta no resulta ser un factor significativo ( $p > 0.05$ ) y, cuando no hay diabetes, los animales mantienen la glucemia durante el ayuno en un nivel semejante al de las ratas alimentadas. Sin embargo, cuando los animales son diabéticos y se encuentran alimentados, los niveles de glucosa son mucho más elevados y más elevados aún en el grupo alimentado con la dieta de aceite de pescado (PE-2E-D). Aunque la concentración de glucosa baja en todos los grupos de diabéticos con el ayuno, los niveles siguen siendo mayores que en los animales no diabéticos, aunque desaparecen las diferencias entre los animales que habían sido previamente alimentados con las distintas dietas.



**Fig. 118:** Concentración plasmática de glucosa en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

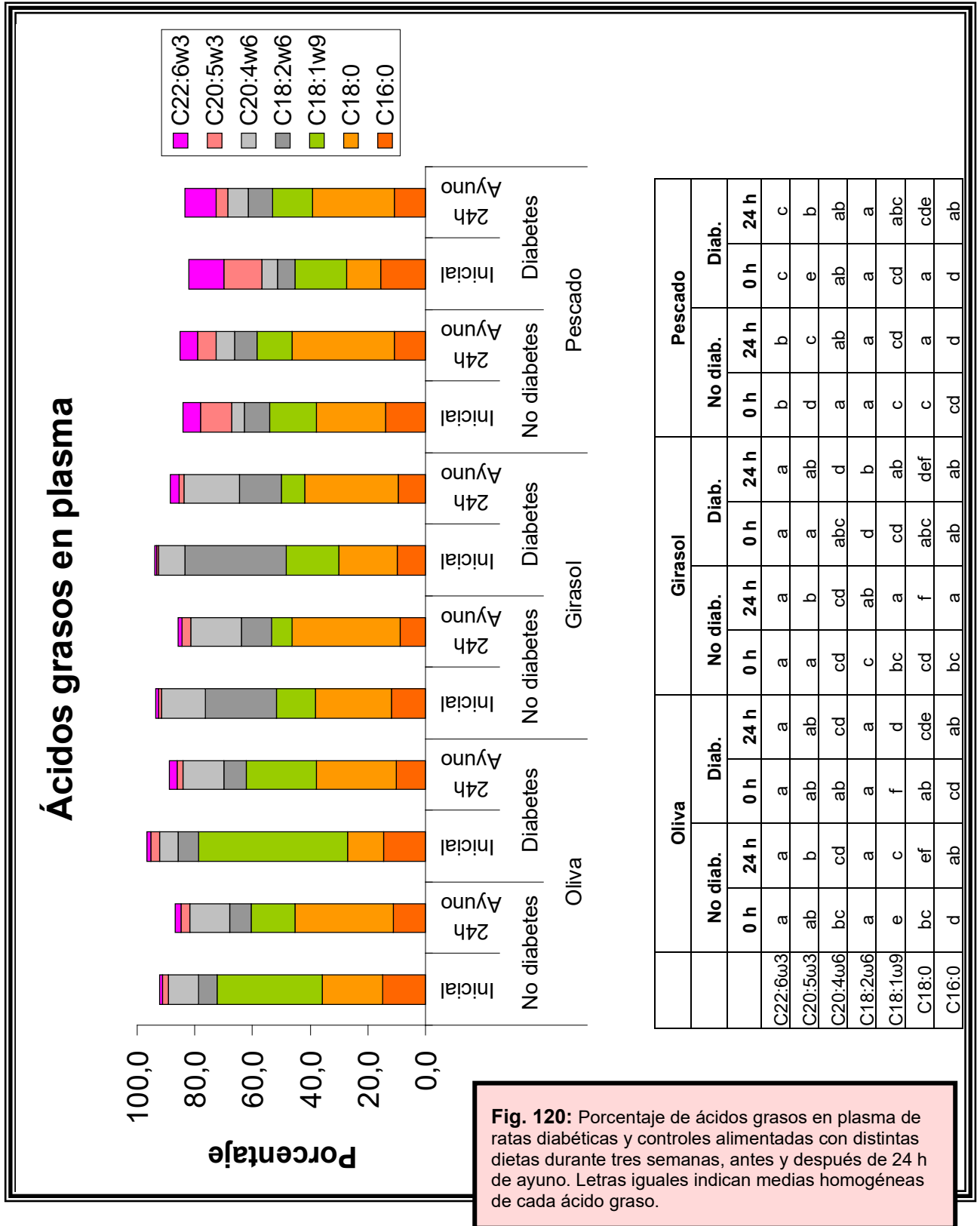
Como reflejo del posible estrés oxidativo, en los animales se midieron en plasma los productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y se cuantificaron tomando como referencia la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico. En la Fig. 119 se representan los resultados de esta cuantificación. Cuando los animales están alimentados, la concentración de TBARS en los controles es superior en las ratas alimentadas con dieta de aceite de pescado que con los otros dos grupos. A su vez, la diabetes incrementa los niveles de TBARS en los tres grupos, pero este efecto es mucho mayor en los de la dieta de aceite de pescado que en los de aceite de girasol o de oliva. A su vez, el ayuno produce en general una disminución significativa ( $p < 0.001$ ) de los TBARS en plasma, de manera que no hay diferencias entre las medias de ninguno de los grupos tras 24 h de ayuno.

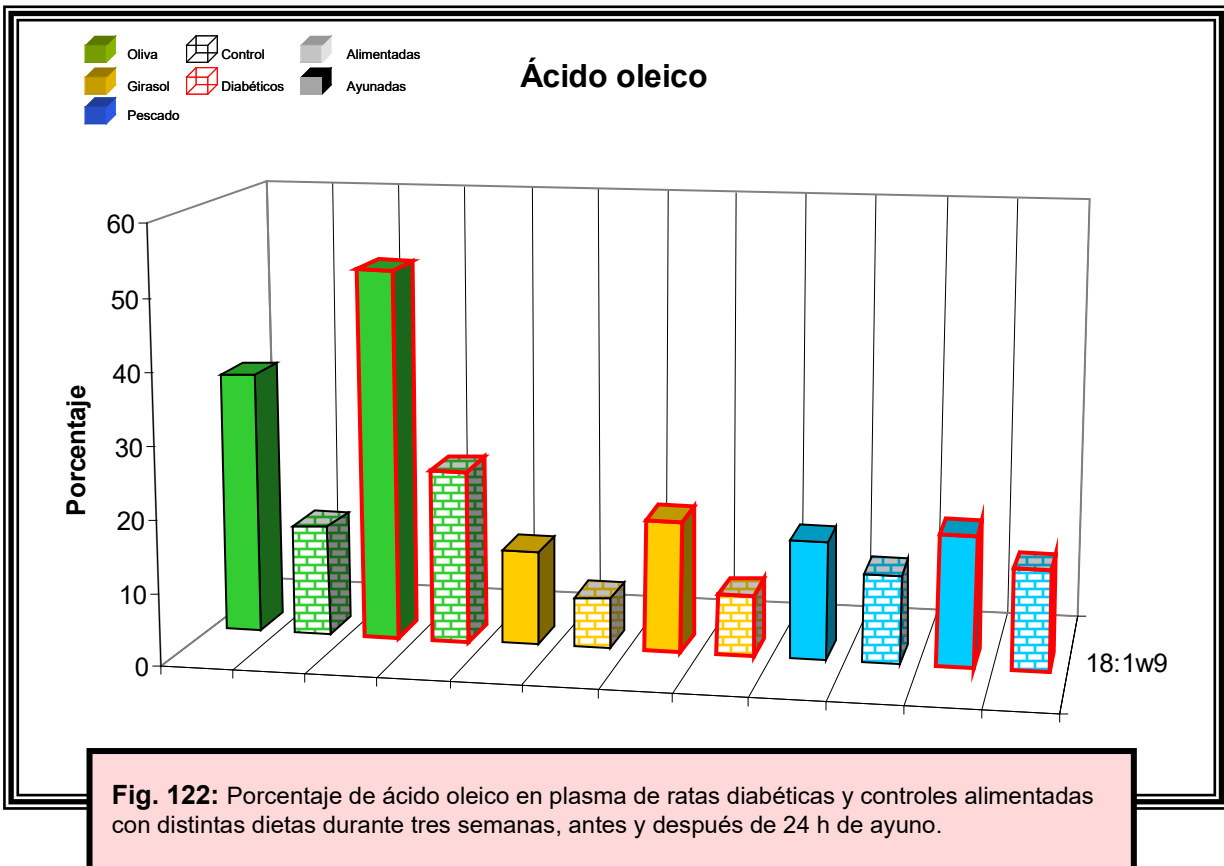
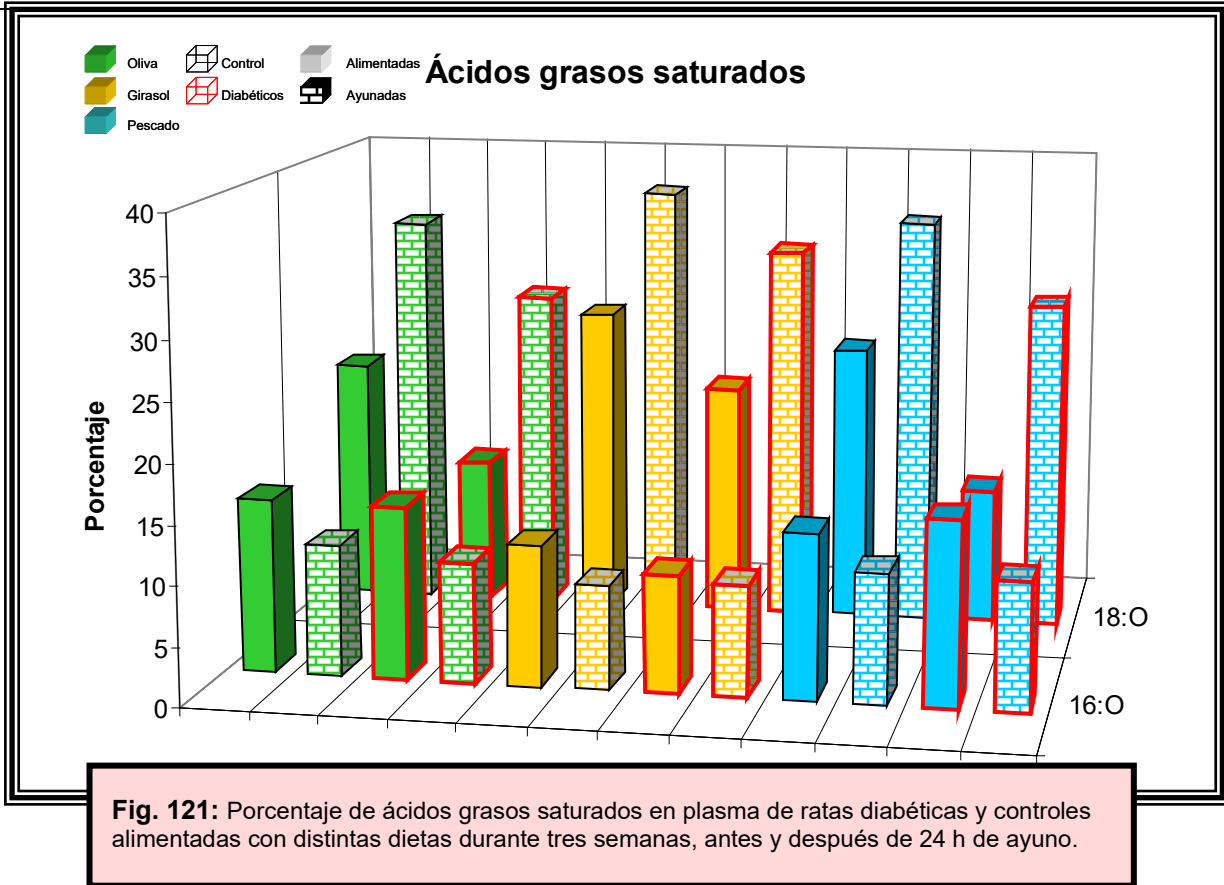
**Fig. 119:** Concentración plasmática de TBARS en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

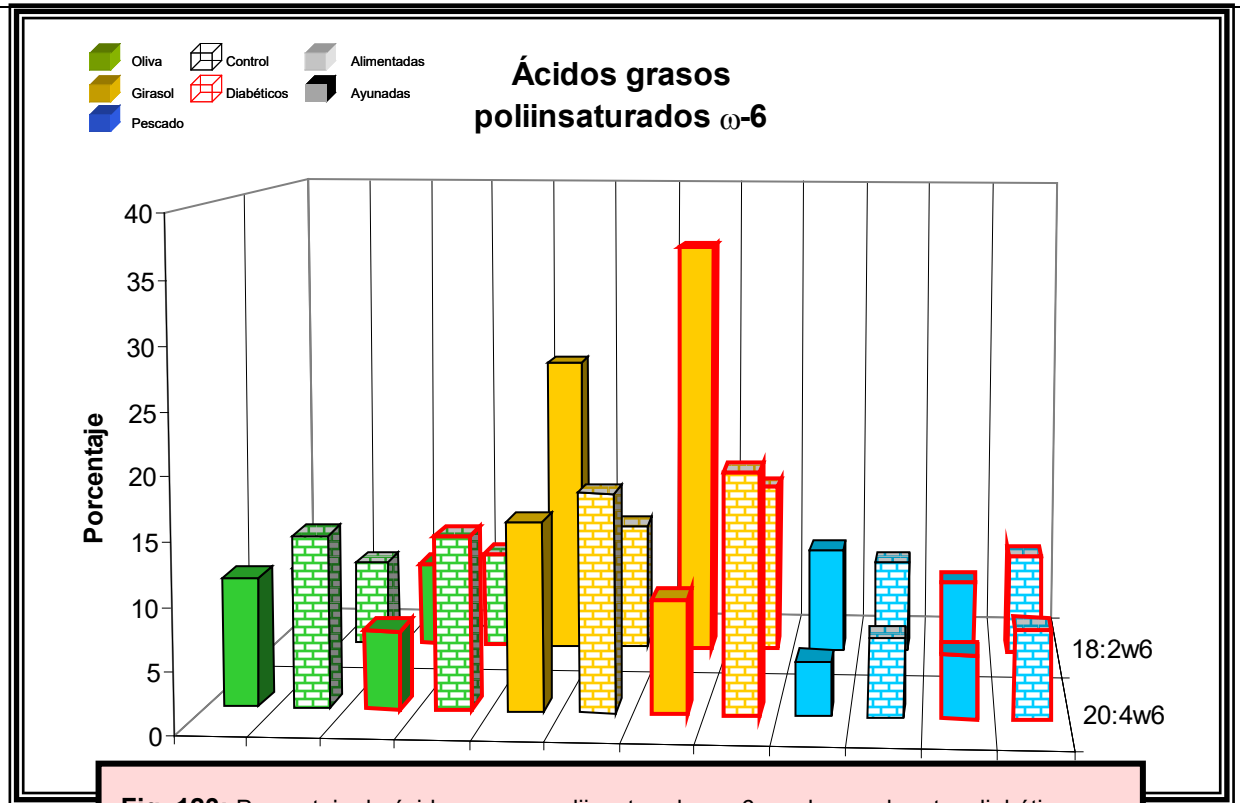


En el plasma de estos animales se determinó el perfil de ácidos grasos. En las ratas alimentadas se puede apreciar que el tipo de dieta lleva a que el perfil de ácidos grasos en plasma sea distinto (Fig. 120), de forma que en cada grupo están elevados los ácidos grasos característicos de cada dieta: en las ratas alimentadas con la dieta de aceite de oliva se observa que el porcentaje de ácido oleico en plasma es mayor que en las otras dos dietas, en el plasma de las de girasol es el porcentaje de ácido linoleico el que está aumentado, mientras que los porcentajes de los poliinsaturados de la serie  $\omega$ -3 (EPA y DHA) están aumentados cuando los animales ingerían la dieta de pescado. En los animales diabéticos se puede observar que, cuando alimentadas, el porcentaje de estos ácidos grasos característicos de cada dieta es superior al de los correspondientes controles y este aumento porcentual se produce a costa principalmente de la proporción de ácidos grasos saturados. El ayuno da lugar a que los porcentajes de los distintos ácidos grasos en todos los grupos se igualen, produciéndose principalmente una disminución en los ácidos grasos saturados. Al disminuir la proporción de ácidos grasos saturados, en cada grupo aumenta la proporción de los ácidos grasos característicos/mayoritarios de cada dieta: en los grupos de oliva (O-2E y O-2E-D) la proporción de oleico aumenta, en los grupos de girasol (G-2E y G-2E-D) se mantienen elevados los  $\omega$ -6 y en los grupos de pescado (PE-2E

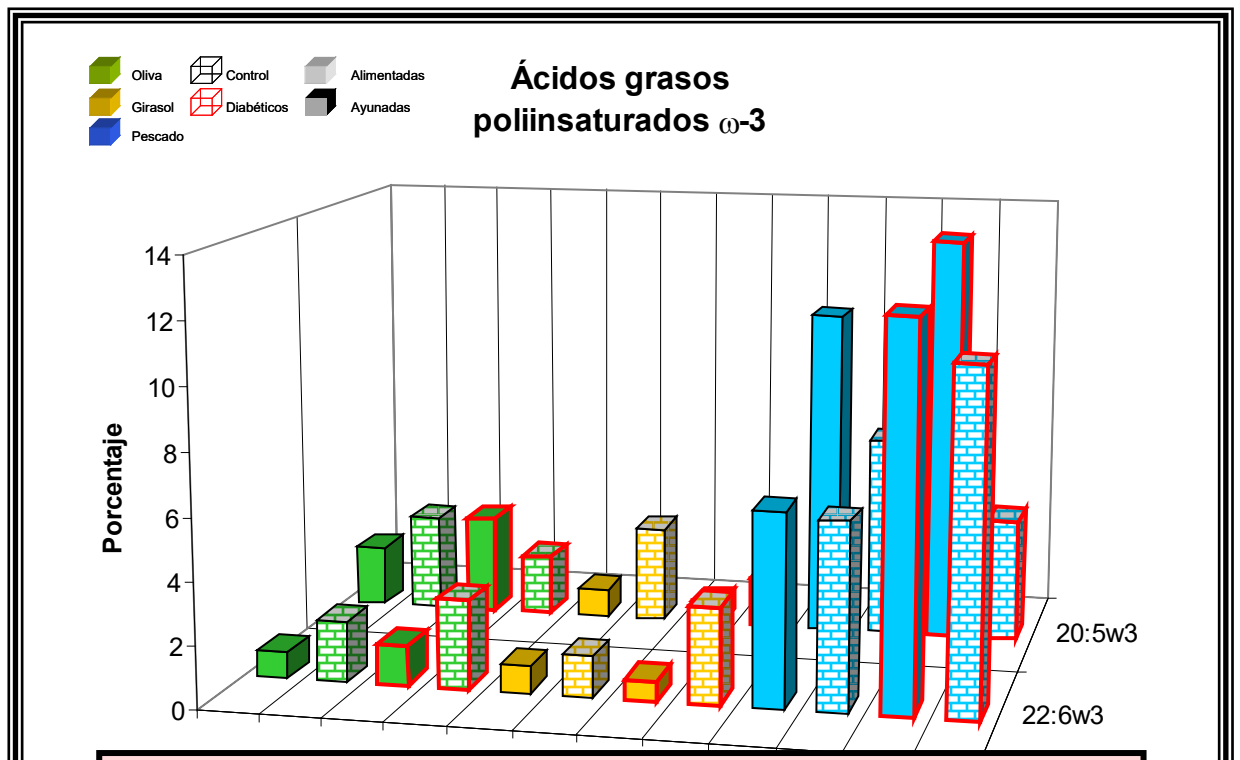
y PE-2E-D) los  $\omega$ -3. Para una mejor interpretación de los resultados se presentan los mismos datos separando los distintos ácidos grasos en las Figs. 121, 122, 123 y 124.





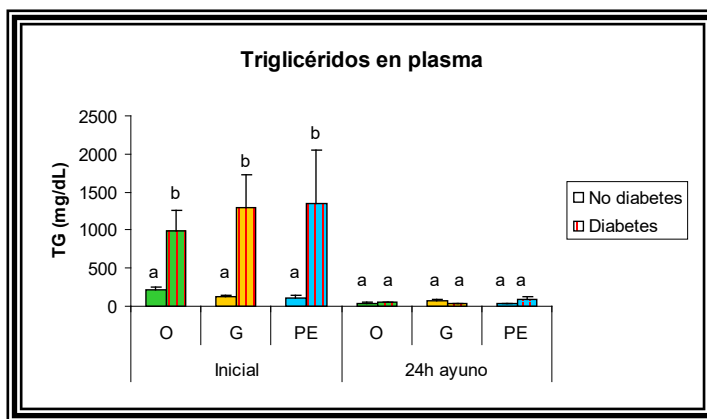


**Fig. 123:** Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados ω-6 en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.



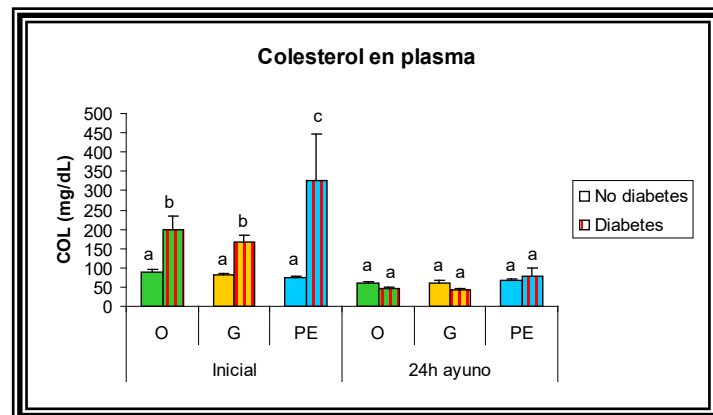
**Fig. 124:** Porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados ω-3 en plasma de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno.

En la Fig. 125 se presentan los valores de la concentración de triglicéridos en plasma. El tipo de grasa de la dieta no modifica los niveles de triglicéridos, de forma que resultó ser un factor no significativo ( $p > 0.05$ ), ni como factor aislado ni como cofactor de interacción con alguno de los otros dos factores. Sin embargo, en los animales alimentados, la diabetes produjo un incremento significativo ( $p < 0.001$ ), de forma que el que los animales fueran diabéticos supuso que, cuando alimentados, presentarían unos niveles muy elevados de triglicéridos, que bajaron con el ayuno hasta no diferir de los controles. El ayuno disminuyó los niveles de triglicéridos ( $p < 0.001$ ), pero de forma global, puesto que en los animales controles esta disminución no llega a ser significativa y las medias de todos los grupos controles son homogéneas entre sí. Al ser esta disminución de triglicéridos asociada al ayuno más acusada en los animales diabéticos, la interacción diabetes-ayuno es muy significativa ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 125:** Concentración plasmática de triglicéridos en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

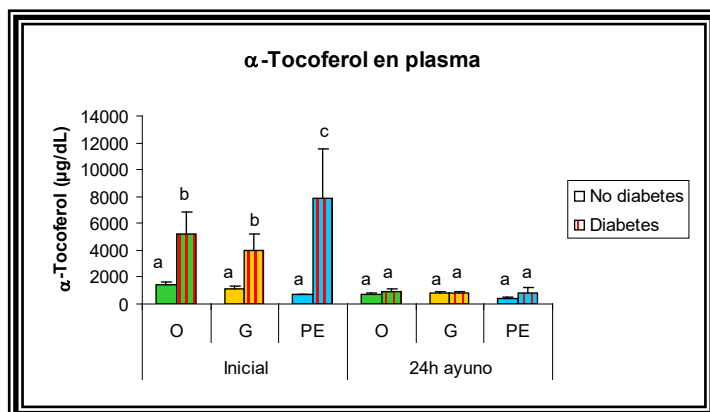
**Fig. 126:** Concentración plasmática de colesterol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).



Los niveles de colesterol en plasma (Fig. 126) siguen una distribución casi paralela a la de los triglicéridos, aunque no idéntica: en los animales alimentados (antes de empezar el ayuno) la concentración plasmática de colesterol en el grupo PE-2E-D es superior a la de los otros dos grupos de ratas diabéticas (O-2E-D y G-2E-D). En conjunto, además, la concentración plasmática de colesterol en el grupo de pescado es superior a la de las otras dos dietas ( $p < 0.05$ ), por

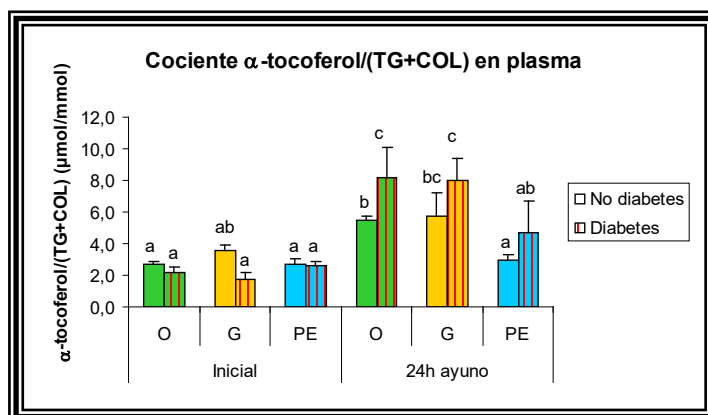


lo que en este caso el tipo de dieta sí que supone una fuente de variación significativa ( $p < 0.05$ ). La diabetes produce en los animales un incremento en los niveles de colesterol ( $p < 0.001$ ), mientras que el ayuno los disminuye significativamente ( $p < 0.001$ ). Esta disminución asociada al ayuno es más pronunciada en los animales diabéticos, por lo que la interacción entre ambos factores es significativa ( $p < 0.001$ ). Dado que la concentración plasmática de colesterol del grupo PE-2E-D tras el ayuno no es distinta de la de los otros grupos y al inicio era incluso superior, es lógico que la interacción entre el factor "dieta" y el ayuno sea significativo ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 127:** Concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

**Fig. 128:** Cociente entre la concentración de  $\alpha$ -tocoferol y la de triglicéridos más colesterol en ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, antes y después de 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

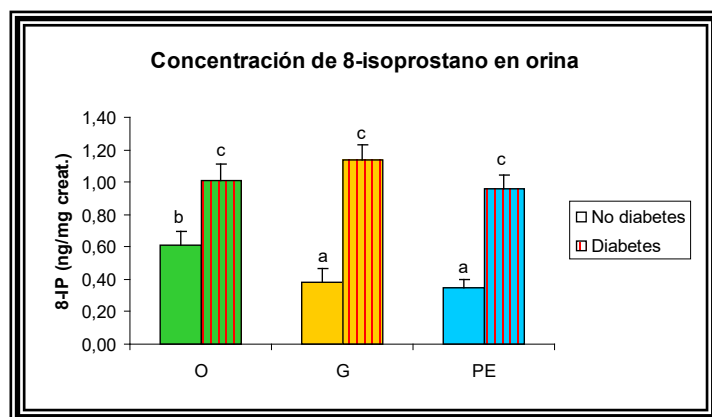


En la Fig. 127 se presentan las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, que presentan un perfil muy similar al de los triglicéridos y colesterol: Cuando los animales están alimentados, la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en los diabéticos es más alta que en los no diabéticos ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, tras el ayuno disminuyen los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en las ratas diabéticas y desaparecen las diferencias significativas entre los grupos y en consecuencia, la interacción ayuno-diabetes sí es significativa ( $p < 0.001$ ) sobre los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol. Tampoco son significativas las diferencias globales según la dieta, pero la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en el grupo PE-2E-D antes del ayuno sí es significativamente superior a la de todos los demás.

En condiciones basales, no se observan diferencias significativas en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol corregida por los lípidos plasmáticos (Fig. 128) y las diferencias en la concentración

de  $\alpha$ -tocoferol que se observaban en los animales alimentados debidas a la diabetes son corregidas por los lípidos totales. En los animales alimentados se puede observar una tendencia (pero no significativa) a que los valores de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos sean inferiores en los grupos de diabéticos, mientras que al final del ayuno se puede observar una tendencia (también no significativa) en sentido contrario: que los valores de este cociente tienden a ser superiores en todos los grupos de animales diabéticos. De esta forma, sobre el cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos la diabetes no resulta ser una fuente de variación significativa ( $p > 0.05$ ), pero sí hay una evidencia de una interacción ayuno-diabetes ( $p < 0.01$ ) que implica que con el ayuno el cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos aumenta más en los animales diabéticos que en los controles. El ayuno, analizado independientemente, eleva significativamente ( $p < 0.001$ ) el valor de  $\alpha$ -tocoferol/lípidos y es distinto este incremento según la dieta, pues en los animales que ingerían la dieta de pescado el cociente no aumenta tanto como en los otros grupos y la interacción ayuno-dieta resulta significativa ( $p < 0.05$ ), aunque el tipo de grasa en conjunto no resulte ser una fuente significativa de variación ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2.5.4 Otros parámetros de estrés oxidativo

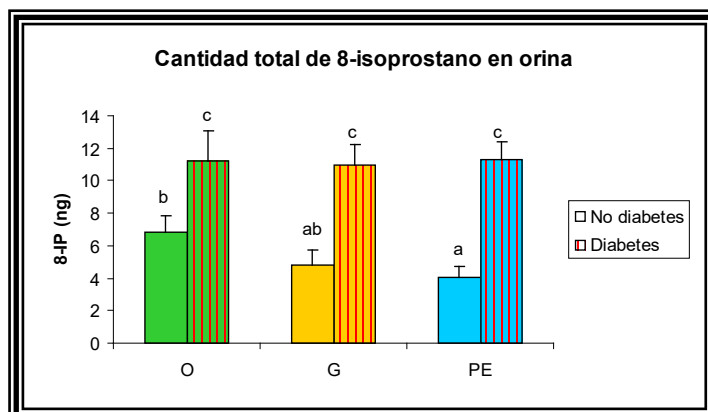


**Fig. 129:** Concentración de 8-IP en orina de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

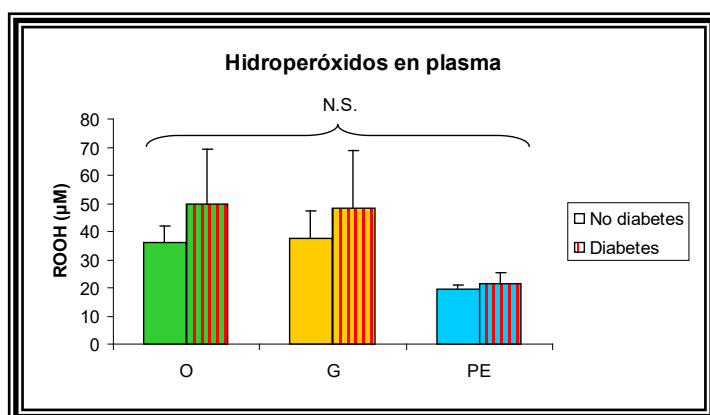
Durante las 24 h del ayuno se recogió la orina de los animales y se valoró en ella la concentración de 8-IP. Para corregir el efecto de la poliuria presente en la diabetes, se valoró también la concentración de creatinina. En la Fig. 129 se presentan los valores de este parámetro. Se observa que la diabetes provoca que se excrete una mayor proporción de 8-IP, sin diferencias entre ninguno de los grupos de diabéticos debidas al tipo de dieta. Aunque tras un ANOVA de dos vías se debe aceptar que no hay diferencias debidas a la dieta, se puede observar que cuando las ratas no diabéticas tomaron la dieta de oliva (O-2E), la concentración de 8-IP fue superior a la de los otros dos grupos no diabéticos (G-2E y PE-2E). Al corregir el efecto de la poliuria determinando la cantidad total de 8-IP (multiplicando la concentración obtenida por el volumen total excretado), los resultados (Fig. 130) son muy similares a los expresados en rela-

ción a la creatinina, pero la cantidad total del grupo G-2E no fue significativamente distinta de la de O-2E.

**Fig. 130:** Cantidad total de 8-IP en orina de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).



En el plasma obtenido tras el sacrificio se cuantificaron los hidroperóxidos totales y los resultados se presentan en la Fig. 131. No existen evidencias significativas de ninguna diferencia debida tanto a dieta como a diabetes. Se pueden observar tan sólo tendencias a que con la diabetes los niveles de hidroperóxidos estén aumentados y a que con la dieta de pescado los niveles sean menores que con las otras dietas.

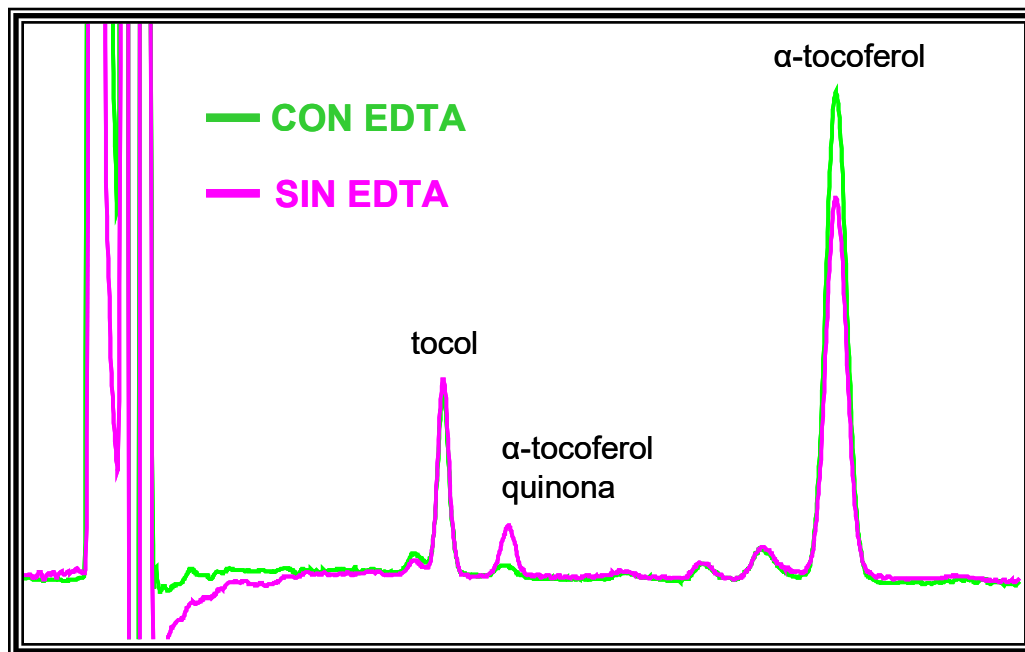


**Fig. 131:** Concentración de hidroperóxidos en plasma de ratas diabéticas y no diabéticas alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

#### 4.2.5.5 $\alpha$ -Tocoferol tisular

Al diseñar el experimento, uno de los parámetros que se pretendía determinar era la presencia y concentración de los principales productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol, la  $\alpha$ -tocoferol quinona y la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, para lo que se puso a punto y validó un nuevo método de análisis. Sin embargo, se demostró que si el método de tratamiento de la muestra incluía la presencia de un complejante de metales como el EDTA, los niveles de cualquiera de los dos productos de oxidación en sangre estaban por debajo de los límites de cuantificación estudiados, que llegaban hasta menos de la décima parte del mínimo encontrado por otros autores [564]. Esto

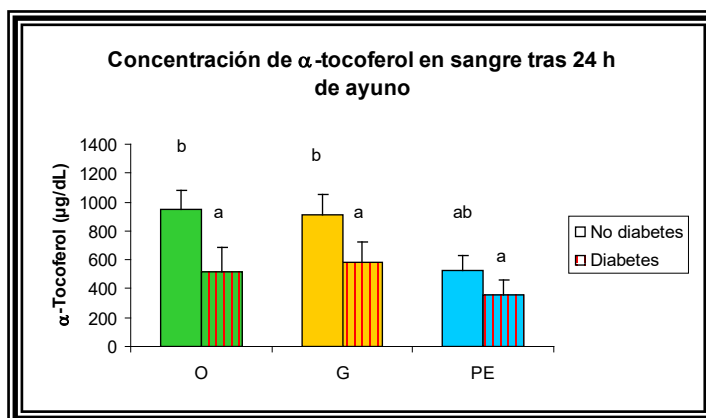
se puede apreciar en la Fig. 132, donde se observan los cromatogramas pertenecientes a dos alícuotas de la misma sangre, que fueron procesadas en paralelo, pero una de ellas con agua en vez de la disolución de EDTA. En ella se puede apreciar que, con respecto a la muestra en la que hay EDTA, cuando no está presente, el pico correspondiente a  $\alpha$ -tocoferol es menor y crece el pico correspondiente a la  $\alpha$ -tocoferol quinona, que en las condiciones óptimas, aunque se puede apreciar ligeramente, está cerca del límite de detección.



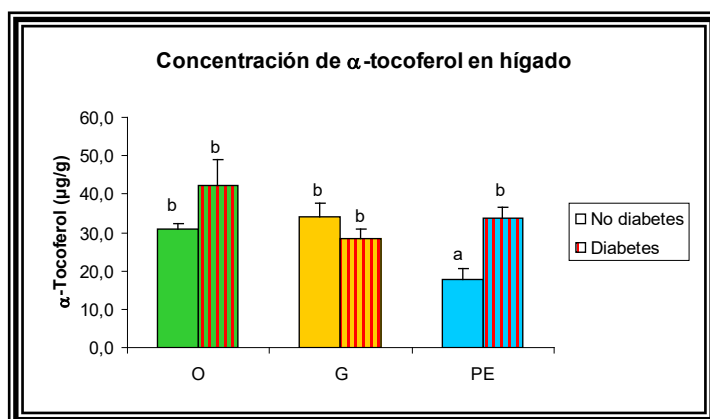
**Fig. 132:** Cromatogramas de dos muestras de una misma sangre, procesadas con y sin EDTA.

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en sangre total se presenta en la Fig. 133. Se puede apreciar que el valor en los animales diabéticos es inferior al de sus correspondientes controles y que la dieta de pescado también produce una disminución en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en sangre. Dado que habíamos observado que en plasma la concentración de  $\alpha$ -tocoferol de las ratas en ayunas no difería entre los grupos (Fig. 127), estas diferencias en sangre total corresponden al contenido de  $\alpha$ -tocoferol en células sanguíneas.

**Fig. 133:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en sangre de ratas diabéticas y no diabéticas alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

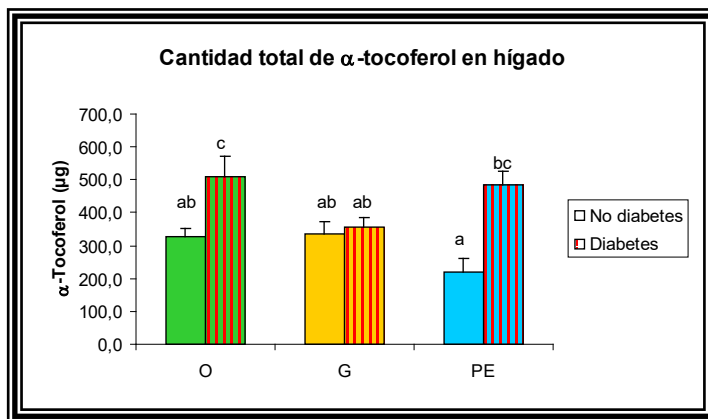


En los valores de concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado (Fig. 134) se puede observar que sólo hay un grupo cuya concentración sea significativamente diferente a la de los otros: la media de concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de las ratas PE-2E es significativamente inferior a la de los otros. Cuando las ratas diabéticas habían ingerido las dietas de oliva o de pescado, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol es más elevada que cuando las ratas controles tomaron la misma dieta (aunque en el caso de oliva ese incremento no es significativo). Sin embargo, ese incremento asociado a la diabetes no se produce en las ratas alimentadas con dieta de girasol. Estas tendencias se intensifican cuando se estima la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado, multiplicando la concentración de  $\alpha$ -tocoferol por el peso total del órgano (Fig. 135). La diferencia entre la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de los grupos PE-2E-D y PE-2E sigue siendo significativa y la diferencia entre la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de O-2E-D y O-2E ahora sí es significativa. Pero cuando los animales tomaron la dieta de aceite de girasol tampoco se observa una diferencia significativa asociada a la diabetes. En la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol no se aprecian diferencias significativas en función del tipo de grasa de la dieta.

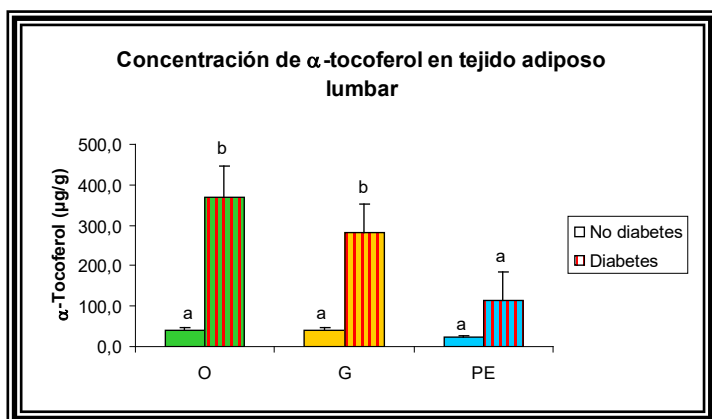


**Fig. 134:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

**Fig. 135:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en hígado de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

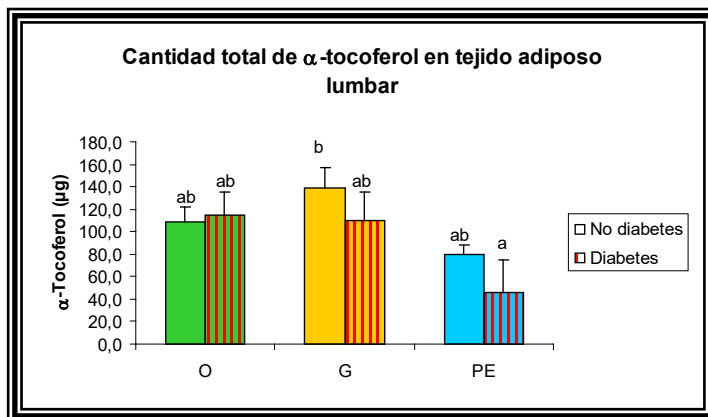


En el tejido adiposo lumbar (Fig. 136) se puede observar que la diabetes incrementa la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en todos los casos, pero en menor medida cuando la dieta que tomaban los animales era la de pescado. Cuando se estima la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo (Fig. 137) se observa que desaparecen las diferencias debidas a la diabetes y que los grupos que tomaron la dieta de aceite de pescado siguen presentando medias inferiores a las de los otros grupos



**Fig. 136:** Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).

**Fig. 137:** Cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo lumbar de ratas diabéticas y controles alimentadas con distintas dietas durante tres semanas, tras 24 h de ayuno. O: Dieta de aceite de oliva (O-2E); G: Dieta de aceite de girasol (G-2E); PE: Dieta de aceite de pescado (PE-2E).



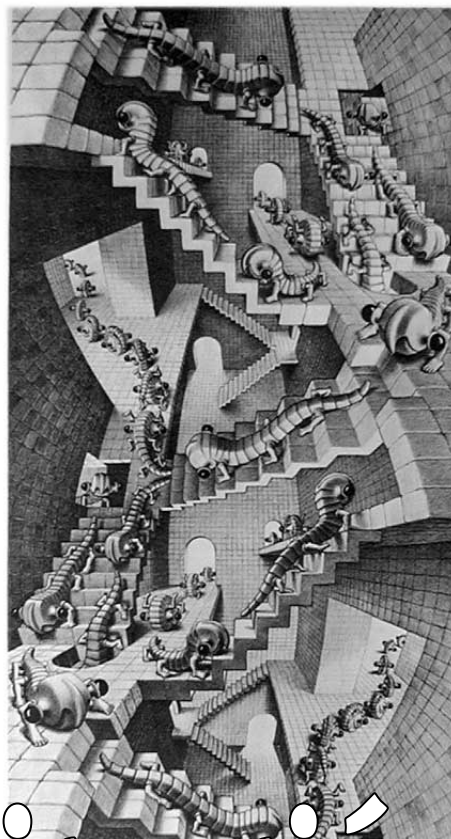
De todos estos resultados podemos destacar dos aspectos que nos parecen relevantes: Por un lado la situación de diabetes, en la que el incremento en los niveles plasmáticos de TBARS y la

mayor excreción urinaria de 8-IP muestran una situación de estrés oxidativo. A pesar de ello, la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol disponible en el organismo no se encuentra reducida y en el caso del plasma, depende especialmente de la hipertrigliceridemia que se desencadena en estos animales, ya que las diferencias de  $\alpha$ -tocoferol entre los grupos desaparecen cuando los datos se corrigen por los lípidos circulantes. Por el otro lado tenemos el caso de la dieta de aceite de pescado, en el que únicamente podemos constatar un incremento en los TBARS en plasma, sin modificación en la excreción urinaria de 8-IP. En este caso sí que hemos constatado de forma consistente una menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol en sangre, en hígado y sobre todo en tejido adiposo, lo cual indica una deficiencia genérica en esta vitamina.

Finalmente conviene comentar la ausencia de productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol en sangre. Ello indica que a pesar de lo descrito en la bibliografía, donde sí han observado la presencia de estos productos en eritrocitos (pero no en plasma) [564-568] no parece que estos productos salgan de los tejidos a la circulación. De hecho, el método aquí puesto a punto tiene la suficiente sensibilidad para detectar estos productos en sangre, pero a diferencia de lo utilizado por otros autores, nosotros hemos protegido la oxidación de las muestras a ensayar mediante la quelación de metales con EDTA. Por ello pensamos que el no haber tenido esta precaución ha hecho que esos otros autores hayan encontrado estos productos, formados probablemente en el procesamiento de las muestras después de su extracción.







# Discusión



## 6 DISCUSIÓN

### 6.1 Validación de métodos analíticos

A lo largo de los apartados correspondientes a la descripción de los resultados obtenidos de las validaciones de los respectivos métodos se han discutido los aspectos más relevantes de cada uno de los nuevos métodos, por lo que no repetiremos aquí lo ya expuesto.

Baste decir que se han puesto a punto y validado nuevos métodos para la valoración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo, de  $\alpha$ -tocoferol en glándula mamaria, de  $\alpha$ -tocoferol en aceites, de  $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol en dietas experimentales y de  $\alpha$ -tocoferol en sangre. Este último método es también válido para la medida de  $\alpha$ -tocoferol quinona y  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona, para los que se han desarrollado nuevos métodos para su síntesis electroquímica.

Los métodos aquí desarrollados se han aplicado en los experimentos con animales que se describen en la presente Tesis.

### 6.2 Experimentos con animales

#### 6.2.1 Experimento 1: Utilización durante la gestación de dietas conteniendo 5% y 10% de grasa

##### 6.2.1.1 Consideraciones previas

En los experimentos con animales de la presente Tesis las ratas se han alimentado *ad libitum* con dietas semisintéticas con un perfil de ácidos grasos muy diferente entre sí, pero con la misma concentración de vitamina E. Las cantidades de grasa empleadas fueron moderadas, inferiores a las usadas frecuentemente en otros estudios en los que se emplearon distintas grasas, que pueden llegar a comprender hasta un 40% de fracción lipídica en la dieta [569].

Los efectos metabólicos globales y sobre el metabolismo de los ácidos grasos de los distintos tipos de dietas aquí utilizados han sido ya descritos y discutidos en profundidad [562]. Por ello, en la presente Memoria nos limitaremos a comentar algunos de esos cambios metabólicos, para relacionarlos con las variaciones en la distribución tisular del  $\alpha$ -tocoferol, que ha constituido el eje central de esta Tesis.

Una de las principales consideraciones que hay que realizar a partir de los resultados de nuestro experimento es que no hemos observado un patrón de distribución tisular de  $\alpha$ -tocoferol

común para los cuatro tipos de dieta estudiadas, en función de la gestación o del porcentaje de grasa en la dieta.

### ***6.2.1.2 Influencia de la gestación sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol***

De una forma global, nuestros resultados muestran que la gestación eleva los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y se observa también que hay un incremento de la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en hígado. Este incremento de  $\alpha$ -tocoferol hepático no se aprecia en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol, sino que se pone de manifiesto en la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en este órgano, teniendo en cuenta que el tamaño del órgano aumenta durante la gestación. No sorprende este cambio paralelo en el  $\alpha$ -tocoferol de plasma e hígado ya que ambos están muy relacionados, pues el  $\alpha$ -tocoferol que circula en el plasma es recaptado en el hígado y vuelve a la circulación [200]. Por el contrario, en el principal tejido de depósito de  $\alpha$ -tocoferol, el adiposo blanco, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol disminuyó con la gestación y aunque el tamaño del tejido adiposo lumbar aumenta con la gestación, al igual que el hígado, esta mayor masa no es suficiente para que la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol en este tejido sea mayor en las ratas preñadas que en las vírgenes. El incremento en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y en hígado confirma estudios de nuestro laboratorio realizados con ratas alimentadas con dieta estándar [191]. A su vez, puesto que la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales no se ve modificada por la gestación, con excepción de las ratas alimentadas con dieta de aceite de girasol al 5%, las variaciones en la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol se pueden considerar paralelas a las de los lípidos circulantes, como se ha demostrado también en el caso de humanos [317].

En nuestro experimento, como era de esperar, se observó la característica hiperfagia asociada a la gestación, lo que podría llevar a pensar que la ingesta de  $\alpha$ -tocoferol en las ratas preñadas fue mayor que en las vírgenes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las ratas preñadas pesan más y que, por tanto, la proporción de vitamina E ingerida por kg de rata no es distinta entre vírgenes y preñadas (10.1 y 9.6  $\mu\text{mol/kg}$  rata/día, respectivamente), lo que implica que las diferencias en la concentración tisular de  $\alpha$ -tocoferol no deberían deberse a esa mayor ingesta de  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, una posible mayor absorción intestinal de  $\alpha$ -tocoferol en la gestante, asociada a la conocida mayor absorción intestinal de lípidos al final de este período [190] sí podría ser uno de los factores que justificarían la mayor concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol en las preñadas. De hecho se sabe que tras la sobrecarga oral de  $\alpha$ -tocoferol sus niveles en plasma alcanzan valores más altos en las ratas preñadas que en las vírgenes [191].

Puesto que no se conocen los posibles cambios en la expresión o en la estimulación/inhibición de la actividad de la  $\alpha$ -TTP hepática como consecuencia de la gestación, no podemos más que especular acerca de si la incorporación de  $\alpha$ -tocoferol a VLDL es o no más eficaz en la gesta-

ción. Dado que se mantiene prácticamente inalterado el cociente  $\alpha$ -tocoferol/lípidos plasmáticos, en nuestros experimentos no hay nada que nos induzca a sospechar algún cambio en la eficacia de incorporación del  $\alpha$ -tocoferol a las VLDL, por lo que eludiremos justificar nuestros resultados en función de la posible diferencia de actividad de esta proteína en la gestante.

El incremento en la producción de VLDL-triglicéridos que se produce al final de la gestación [271-273, 276, 278, 570-572] supone también un incremento en la salida de  $\alpha$ -tocoferol a plasma, puesto que las VLDL son el único vehículo conocido de salida del  $\alpha$ -tocoferol hepático a la circulación. Asimismo, en el último tercio de la gestación, la actividad LPL varía en sentido opuesto en el tejido adiposo y en la glándula mamaria. De hecho, la hipertrigliceridemia materna ha sido asociada al descenso de la actividad de esta enzima en el tejido adiposo [573-575], lo que lleva a suponer que el aclaramiento de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma puede también estar retrasado, contribuyendo así a su elevación. Sabemos que la actividad LPL aumenta en glándula mamaria y que juega un papel importante en la captación del  $\alpha$ -tocoferol circulante [191], pero este efecto se produce alrededor del parto, después de que tenga lugar la disminución de actividad LPL en tejido adiposo. De hecho, pensamos que esa disminución de la LPL en adiposo puede ser uno de los factores que contribuyen no sólo al aumento de  $\alpha$ -tocoferol en plasma e hígado, sino también a su disminución en el tejido adiposo. La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo durante la gestación no ha sido estudiada previamente, en humanos o en ratas. En nuestro laboratorio se han hecho experimentos con ratas Wistar, en las que se encontró que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en ratas vírgenes sin tratar era ligeramente inferior a las equivalentes de nuestros experimentos (teniendo en cuenta que la dieta que tomaban era distinta) y se observó también que existía una tendencia a que los valores de concentración de  $\alpha$ -tocoferol en las ratas preñadas eran ligeramente inferiores a los de las vírgenes, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas [191].

Aunque esté demostrado y aceptado que el estrés oxidativo aumenta durante la gestación [281], en nuestro experimento este aumento no resultó ser lo suficientemente grande como para disminuir los valores de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos por debajo de los que tienen los animales no gestantes en los casos de los animales alimentados con dietas de aceite de oliva o palma. Sin embargo, en el caso de los animales alimentados con las dietas de aceite de girasol y de pescado, no observamos el incremento de  $\alpha$ -tocoferol en plasma (concentración) e hígado (concentración y total) asociado a la combinación de gestación y dieta de 10% y ello podría ser consecuencia del mayor porcentaje de PUFA en estos aceites, que junto con la mayor ingesta de las ratas preñadas podría contribuir a este efecto.

### 6.2.1.3 *Influencia del porcentaje de grasa en la dieta sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol*

De forma global, cuando las ratas tomaron las dietas con un 10% de grasa la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma fue menor que cuando las dietas contenían un 5%. A su vez, en consonancia con los resultados en plasma, en la placenta también se observó que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol fue menor cuando los animales tomaron las dietas con un 10% de grasa que con un 5% y esta diferencia era especialmente manifiesta en los animales que tomaban la dieta de aceite de girasol. En hígado, tanto la concentración como la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol presente fue superior cuando las ratas tomaron las dietas con un 10% de grasa. En el tejido adiposo no se observaron esas diferencias en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en función del porcentaje de grasa de la dieta, pero puesto que se observó un aumento del tamaño del tejido adiposo, sí que hubo una tendencia a que hubiera más  $\alpha$ -tocoferol en el total del órgano.

En estudios con ratas, utilizando cantidades moderadas o bajas de grasa en la dieta, similares a las empleadas en nuestros experimentos, no se han observado modificaciones en la absorción aparente de vitamina E [187, 188]. En general, es más aceptado que la absorción intestinal y la secreción a la linfa en los quilomicrones depende de la abundancia relativa de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta [194]. Puesto que en nuestras dietas la concentración de  $\alpha$ -tocoferol es la misma, podemos suponer que no hubo diferencias en la proporción de  $\alpha$ -tocoferol absorbida en el intestino, en función de la cantidad de grasa de la dieta.

El que en el plasma de los animales que tomaban las dietas con un 10% de grasa se encontrara menos  $\alpha$ -tocoferol que en el de los grupos del 5% puede estar motivado por un hecho inherente al experimento: Dado que las ratas ajustan la cantidad de alimento que toman de manera que presenten una ingesta isocalórica, la cantidad de dieta ingerida cuando tomaban la dieta con un 10% de grasa fue menor (dentro de cada conjunto de ratas preñadas o no preñadas) y consecuentemente, la cantidad total de vitamina E ingerida fue menor, puesto que no había diferencias significativas en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol de las dietas. Esto justificaría que la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol, fuertemente dependiente de la ingesta reciente [576], fuera menor en estos animales.

La relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales fue también mayor cuando las ratas tomaron la dieta con un 5% de grasa, excepto en el caso de la grasa de palma, por motivos que se explicarán más adelante. Esto está de acuerdo con el hecho de que también en las dietas la relación  $\alpha$ -tocoferol/grasa es mayor en las del 5%.

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado es menor cuando los animales ingerían la dieta con un 5% de grasa, lo cual apoya la hipótesis de que cuanto mayor es la concentración en plasma, menor es en hígado. La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo, por su parte, no se ve

modificada por el porcentaje de  $\alpha$ -tocoferol en la dieta y los valores son muy similares entre todos los grupos.

Pero cuando los animales ingirieron la dieta con un 10% de grasa se observó un aumento de peso global de los animales, que se correspondía con un aumento del tamaño (peso) de los órganos estudiados. Aunque en ningún caso la diferencias entre los órganos con los correspondientes grupos de 5% llegó a ser significativa, sí fue consistente en todas las dietas y este aumento de peso del hígado y del tejido adiposo lumbar motiva que la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en ambos órganos fuera superior cuando los animales tomaban la dieta con un 10% de grasa.

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta sigue el mismo patrón de distribución que en el plasma y se observa una tendencia a la disminución de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol cuando la dieta tiene más grasa, en todas las dietas excepto en la de palma. El proceso de transporte de  $\alpha$ -tocoferol a través de la placenta se ha aceptado clásicamente que es un proceso de difusión pasivo, sólo dependiente de concentración [229, 317]. Aunque se han ido acumulando evidencias acerca de la presencia de  $\alpha$ -TTP en el útero de ratón [223, 577] y de la actividad TBP en el citosol de placenta humana, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta, en nuestro experimento, parece depender sólo de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma materno y por eso es menor cuando el contenido en grasa de la dieta es mayor.

A su vez, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado fetal no varía cuando las madres ingieren una dieta más o menos rica en grasa. Aunque en humanos una suplementación con vitamina E en la última etapa de la gestación no supusiera un incremento en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en la sangre del cordón umbilical [322], en nuestro laboratorio se ha encontrado que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de fetos de ratas a término se correlaciona con el que se administra a la madre (150 mg de  $\alpha$ -tocoferol administrados en una sola dosis en dos días seguidos frente a ninguna suplementación) [578]. Frente a este último estudio podrían encontrarse nuestros resultados, en los que no se observa diferencia en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado fetal en función del porcentaje de grasa, pero hay que tener en cuenta que, aunque ya hemos dicho que en nuestro estudio la ingesta de vitamina E es distinta según el porcentaje de grasa en la dieta, las diferencias en la ingesta total de vitamina E en nuestro experimento no son tan acusadas. A su vez, dado el limitado transporte placentario de vitamina E [326], cabe pensar que para obtener diferencias importantes en el paso se requieran grandes diferencias en la concentración plasmática, lo que no ocurre en nuestro experimento.

#### 6.2.1.4 Influencia del tipo de grasa en la dieta sobre la distribución tisular de $\alpha$ -tocoferol

Hubo un factor imposible de controlar en nuestro estudio que fue el porcentaje de RRR- $\alpha$ -tocoferol en la dieta y por tanto la cantidad de RRR- $\alpha$ -tocoferol que ingerían los animales. Los aceites empleados tenían distinta concentración de  $\alpha$ -tocoferol, que no sabemos si era de origen natural o añadido durante el proceso de refinado y, aunque la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol de la dieta dependía fundamentalmente del acetato de *all rac*- $\alpha$ -tocoferol añadido, un pequeño porcentaje de RRR- $\alpha$ -tocoferol, que no supusiera un aporte cuantitativamente importante a la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol, podría haber supuesto un factor de enriquecimiento en  $\alpha$ -tocoferol de las lipoproteínas circulantes debido a la actividad de la  $\alpha$ -TTP, que incorpora preferentemente RRR- $\alpha$ -tocoferol a las VLDL [48, 79, 200, 579-583].

El aceite de girasol tiene más  $\alpha$ -tocoferol que ningún otro de los otros aceites empleados para la preparación de las dietas. Si todo ese  $\alpha$ -tocoferol fuera RRR- $\alpha$ -tocoferol, aunque la dieta preparada con este aceite no tenga una concentración de  $\alpha$ -tocoferol significativamente diferente de las otras, habría mayor porcentaje de RRR- $\alpha$ -tocoferol que en las otras dietas, lo que justificaría el que la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma sea superior cuando las ratas tomaban la dieta con un 5% de aceite de girasol.

Los aspectos más llamativos del efecto de la ingesta de las distintas dietas sobre la distribución tisular de  $\alpha$ -tocoferol se encuentran en las dos dietas más opuestas: la de palma, con un alto contenido en ácidos grasos saturados y la de pescado, con un perfil de ácidos grasos muy rico en ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de la serie  $\omega$ -3.

En nuestro laboratorio se ha puesto recientemente de manifiesto que la dieta de palma produce una disminución en la actividad LPL de tejido adiposo en la rata (López-Soldado, I., datos sin publicar). Esta menor actividad justificaría la menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo de los animales que tomaban esta dieta, asociado con unos niveles mayores de  $\alpha$ -tocoferol "circulante" (en plasma e hígado) y más acusado aún en el caso de las preñadas alimentadas con la dieta con un 10% de grasa de palma.

Por otra parte, al igual que se ha demostrado en otros estudios en ratas alimentadas con dietas con grasa de pescado frente a dietas ricas en otros ácidos grasos poliinsaturados [248, 250, 251], en todos los tejidos estudiados la concentración y la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos de las ratas alimentadas con aceite de pescado fue menor. En nuestro experimento también se puso de manifiesto que la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales era también menor cuando los animales tomaban esta dieta frente a las de palma o girasol. Se ha demostrado también en humanos que una disminución similar de la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol que tomaban suplementos de aceite de pescado no se debía a la conocida acción hipolipe-



mante de estos aceites, pues la relación de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol frente a la concentración de EPA y DHA estaba también disminuida [254].

La hipótesis más comúnmente aceptada y que es acorde con nuestros resultados, es que la disminución absoluta y relativa de  $\alpha$ -tocoferol en las ratas alimentadas con la dieta rica en aceite de pescado se debe al consumo aumentado de  $\alpha$ -tocoferol para detener una peroxidación lipídica que debe ser mayor cuando el medio lipídico es más rico en ácidos grasos poliinsaturados.

Este efecto de la dieta de aceite de pescado reduciendo la concentración tisular de  $\alpha$ -tocoferol se hace especialmente patente en el hígado de los fetos. En ellos se sumarían dos factores: 1) una menor llegada de  $\alpha$ -tocoferol de la madre debido a su menor concentración en plasma y 2) un mayor consumo del  $\alpha$ -tocoferol que les llega, como consecuencia de su mayor proporción en PUFA [562].

#### **6.2.1.5 Interacciones entre los distintos factores**

Como ya se ha comentado previamente, la influencia de cada uno de los factores estudiados sobre la distribución tisular de  $\alpha$ -tocoferol no es ejercida independientemente, sino que los datos presentados en el capítulo de Resultados de la presente Memoria indican que la interacción de los distintos factores modifica en cada caso las tendencias generales observadas.

En cada uno de los tejidos estudiados, el tipo de grasa de la dieta es el principal factor que distorsiona las tendencias globales de distribución tisular de  $\alpha$ -tocoferol asociadas a la gestación o al porcentaje de grasa en la dieta.

Así, cuando las ratas preñadas toman la dieta de palma del 10%, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma e hígado es más elevada que en ningún otro caso, a la vez que su concentración en el tejido de depósito estudiado (adiposo lumbar) es menor que en ningún otro caso. Como ya se ha comentado, la disminución de la actividad LPL del tejido adiposo durante la gestación, unido a la posible disminución de la misma actividad asociada al mayor consumo de ácidos grasos saturados en la dieta podría justificar esta distribución.

Cuando los animales tomaban la dieta de aceite de girasol, la relación  $\alpha$ -tocoferol/lípidos totales en plasma de los animales alimentados con la dieta con un 5% es mayor que la de los otros grupos y la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo de las ratas vírgenes alimentadas con un 10% de este aceite es superior a la de los otros grupos. Esta mayor abundancia de  $\alpha$ -tocoferol en estos animales alimentados con dieta de aceite de girasol podría ser consecuencia de un mayor contenido de RRR- $\alpha$ -tocoferol en este aceite, como hemos comentado anteriormente.

## **6.2.2 Experimentos 2, 3 y 4: Ingesta durante la gestación y la lactancia de dietas de oliva, pescado o pescado suplementadas, e intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes**

Los fetos de ratas alimentadas con dietas de aceite de pescado presentaban una deficiencia en  $\alpha$ -tocoferol frente a los fetos de madres que consumían la dieta de oliva y esa deficiencia se observó tanto en plasma como en cerebro, por lo que interesó conocer su desarrollo postnatal, para constatar si la deficiencia observada en vitamina E podía ser recuperada con una dieta adecuada durante la lactancia o se encontraba asociada a algún retraso en el desarrollo postnatal, tanto físico como psicomotor. Además de esta deficiencia en  $\alpha$ -tocoferol, los fetos del grupo de pescado presentaban también una deficiencia en ácido araquidónico, que podría estar disminuido por una combinación de diversos factores, entre los que cabe destacar una inhibición de la actividad  $\Delta 6$  desaturasa como consecuencia de la ingestión de una dieta muy rica en PUFA [584-586].

Para corroborar el efecto de la disminución de  $\alpha$ -tocoferol sobre el desarrollo de las crías de madres alimentadas durante la gestación y la lactancia con dieta con aceite de pescado, pensamos en la posibilidad de que la suplementación de la dieta con  $\alpha$ -tocoferol pudiera revertir esta situación. A su vez, puesto que la dieta de aceite de pescado producía una deficiencia en ácido araquidónico, se prepararon también otros dos grupos experimentales cuya dieta estaba basada en la de aceite de pescado y que fueron suplementadas con ácido araquidónico o con un precursor del araquidónico, el ácido  $\gamma$ -linolénico. Asimismo, si la deficiencia observada en ácido araquidónico se debiera a un estrés oxidativo aumentado, la suplementación con vitamina E podría neutralizar la peroxidación lipídica y evitar la degradación del ácido araquidónico.

Al observar los efectos negativos de la dieta de aceite de pescado sobre el desarrollo de las crías, en combinación con estos experimentos, quisimos comprobar si era más importante la dieta de la madre durante la gestación o durante la lactancia, o si la madre tenía que tomar la dieta de aceite de pescado durante las dos etapas para que aparecieran efectos adversos.

Observamos que desde el mismo día del nacimiento, las crías de madres alimentadas con dietas de aceite de pescado son menores y estas diferencias aumentan a medida que transcurre la lactancia. Este retraso corporal se manifiesta también en el peso del hígado, que disminuye en la misma proporción, puesto que el tamaño relativo del hígado de las crías no varía según la dieta de la madre. Sin embargo, el peso del cerebro de las crías cuyas madres tomaban las dietas basadas en el aceite de pescado no disminuye en proporción con el peso corporal. De hecho, en estos grupos el tamaño relativo del cerebro incluso aumenta, mostrando un esfuerzo

del organismo de las crías por mantener el tamaño absoluto de este órgano próximo a los valores que tienen los cerebros de las crías de referencia.

Otros parámetros aquí estudiados refuerzan la constatación del retraso en las crías de madres alimentadas con la dieta de pescado, como son los retrasos en cuanto a la edad de apertura de ojos y del conducto auditivo, en comparación con las crías de madres alimentadas durante la gestación y la lactancia con una dieta que contiene aceite de oliva.

En relación con el desarrollo psicomotor, está establecido un patrón de aparición de determinados reflejos en la rata [550, 587] y en el presente estudio se han analizado algunos de ellos. Los resultados de estos ensayos reflejan que también la maduración psicomotora se produce con retraso en las crías del grupo de pescado en relación a las del grupo de oliva.

No se han encontrado en la literatura estudios acerca de un desarrollo físico y psicomotor alterado asociado a una carencia de vitamina E, pero los síntomas de las enfermedades congénitas que cursan con déficit en vitamina E incluyen retrasos asociados a degeneración neuronal [588, 589]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el paralelismo de estas enfermedades congénitas con nuestro estudio no es adecuado, puesto que en las crías de madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado sí se encuentra  $\alpha$ -tocoferol y tras el parto, aunque la disponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos sea menor que en el caso de las crías del grupo de oliva, no parece adecuado describir esta situación como carencial. Faltan estudios que relacionen la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol disponible en el organismo con el grado de subdesarrollo.

Existen sin embargo estudios anteriores en los que se obtuvieron resultados similares a los nuestros: cuando las madres ingieren una elevada cantidad de  $\omega$ -3, las crías presentan un menor desarrollo corporal [313, 590] y cerebral [313, 591], así como un desarrollo neuronal retrasado en crías de madres alimentadas durante la gestación y la lactancia con dieta rica en ácidos grasos  $\omega$ -3 [313, 590, 592]. El efecto de los ácidos grasos  $\omega$ -3 de la dieta materna sobre el desarrollo de la descendencia puede ser positivo o negativo, dependiendo de la forma y cantidad en que se ingieren (suplementación, aporte en la dieta, como precursores o ya formados, proporción  $\omega$ -6/ $\omega$ -3...) y, aunque parece demostrado el papel esencial del DHA en el desarrollo visual y neuronal [313, 314, 406, 593], existen evidencias de los efectos negativos de un aporte excesivo de  $\omega$ -3, que se han asociado con alteraciones en el metabolismo lipídico y/o en la mielinización de los axones neuronales [313, 590]. Se ha llegado a correlacionar este efecto negativo con la dosis de  $\omega$ -3 [594] y en todos estos estudios la deficiencia siempre fue asociada a la influencia directa de los ácidos grasos  $\omega$ -3 (especialmente el DHA) sobre el desarrollo.

Los efectos negativos de la dieta de pescado sobre el desarrollo de las crías también podrían estar influidos en parte por la menor producción de leche. No ha sido investigado si una deficiencia en vitamina E podría disminuir la cantidad de leche producida por la glándula mamaria,

pero la menor producción de leche no coincide con una menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria: a pesar de que en el plasma de las madres alimentadas con dieta de pescado es menor, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria no es distinta entre el grupo de madres alimentadas con dieta de aceite de oliva y el de pescado. Por otra parte, se ha descrito un papel importante del ácido araquidónico en la producción de leche, pues si no hay suficiente cantidad de este ácido, se puede incluso llegar a inhibir el efecto secretagogo de la prolactina [595] y se encontró en nuestros animales que había una menor concentración de ácido araquidónico en la glándula mamaria en el grupo de pescado.

Las madres que ingieren durante la gestación y la lactancia la dieta de pescado presentan un menor peso que las del grupo de oliva y esto se refleja en el peso del tejido adiposo lumbar y en el de la glándula mamaria, con lo que la reserva de grasas para ser utilizadas como sustrato para la síntesis de leche es también menor. El menor peso del tejido adiposo lumbar en las ratas alimentadas con la dieta de pescado podría deberse a un aumento de la lipólisis como consecuencia de que los ácidos poliinsaturados son un buen sustrato para la HSL y por tanto su depósito en el tejido adiposo blanco es bajo [596]. Nuestros resultados concuerdan con esta interpretación, ya que las ratas alimentadas durante la gestación con la dieta de pescado presentan un menor peso del tejido adiposo lumbar que las gestantes alimentadas con otro tipo de grasa.

Puede ocurrir también que, si las crías del grupo de pescado son más pequeñas, tienen menos fuerza de succión y el estímulo para la estimulación de la secreción puede ser menor. Pero en nuestro estudio la menor producción de leche de las madres alimentadas con dieta de aceite de pescado no debe ser la única causa del retraso generalizado de sus crías, pues aunque existen estudios que han descrito una disminución en el peso de las crías por una menor producción de leche de madres malnutridas [550, 597], los parámetros del desarrollo psicomotor no estaban tan afectados. Es por este motivo por el que parece que la composición de la leche podría estar también influyendo en el desarrollo de las crías.

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la leche de las madres alimentadas con dieta de pescado es muy inferior a la de las de oliva. El mecanismo por el que el  $\alpha$ -tocoferol es incorporado a la leche en la glándula mamaria está mediado por la actividad de la LPL [191] y aunque se ha propuesto que la transferencia de  $\alpha$ -tocoferol del plasma a la leche podría estar disminuida en condiciones de privación de  $\alpha$ -tocoferol [598-600], la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la glándula mamaria no fue diferente entre los grupos de pescado y de oliva. Sí se observaron diferencias en la cantidad total de  $\alpha$ -tocoferol en el total de la glándula, puesto que el tamaño de este órgano era menor en las ratas alimentadas con dieta de aceite de pescado, en paralelo al menor peso corporal total de estas ratas.

La menor proporción de  $\alpha$ -tocoferol en la leche de las madres así como la menor producción de leche del grupo de pescado da lugar a que sus crías tengan una importante reducción de la disponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol y con ello tengan una menor proporción de  $\alpha$ -tocoferol tanto en plasma como en hígado. Como ya se ha indicado, las deficiencias congénitas de vitamina E en el hombre dan lugar a cuadros clínicos con ataxias cerebelares, que indican un daño neurológico, pero no producen efectos que se puedan confundir con cuadros de malnutrición. En nuestros experimentos encontramos que las diferencias en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el cerebro fueron siempre muy pequeñas, por lo que pensamos que, aunque en plasma e hígado de las crías de los grupos con dietas basadas en aceite de pescado la concentración de  $\alpha$ -tocoferol fuera menor que en las crías de los grupos de oliva, esta disminución no llega a suponer una situación deficitaria para el desarrollo neuronal.

Con el propósito de elevar las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en las crías de madres alimentadas con la dieta de pescado se suplementó la dieta de las madres con acetato de  $\alpha$ -tocoferol y así poder determinar si el retraso observado en las crías de pescado podía ser revertido, bien por un efecto protector directo del  $\alpha$ -tocoferol contra el posible incremento en el estrés oxidativo, bien porque el  $\alpha$ -tocoferol protegiera a los ácidos grasos poliinsaturados (en especial al ácido araquidónico) de la peroxidación lipídica.

Nuestros resultados muestran que la suplementación con acetato de  $\alpha$ -tocoferol es suficiente para elevar la disponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos de las crías hasta valores equivalentes a los de las crías cuyas madres tomaban la dieta de aceite de oliva. Si embargo, esta suplementación no produce una mejora en el desarrollo de las crías en cuanto a los parámetros corporales ni a la maduración psicomotora. Podemos concluir, por tanto, que el cuadro de malnutrición y retraso en el desarrollo psicomotor de las crías cuyas madres ingieren la dieta de aceite de pescado durante la gestación y la lactancia no se debe a una carencia de vitamina E. Además, la deficiencia en ácido araquidónico no es producida por un aumento en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica, puesto que la suplementación con vitamina E no restaura su concentración [601].

Por otra parte, la suplementación de la dieta de las madres con ácido  $\gamma$ -linolénico y, en menor medida, con araquidónico, permite que las crías mejoren sus resultados en las pruebas de evaluación del desarrollo psicomotor, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol de los tejidos de estas crías es tan bajo como el de las crías del grupo de pescado sin ninguna suplementación. En consecuencia, podemos concluir que es la diferencia en ácido araquidónico y no en  $\alpha$ -tocoferol, la responsable del retraso en el desarrollo postnatal de las crías de madres que ingieren dieta de aceite de pescado.

El menor peso de la glándula mamaria y la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados en glándula mamaria y en leche, así como la menor producción de leche en las madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado, puede explicar el que las crías que nacen de madres del grupo de oliva pero lactan de las de pescado, presenten un desarrollo postnatal retrasado y semejante al de las crías que nacen y lactan de las madres del grupo de pescado.

Es decir, que independientemente de la dieta de las madres durante la gestación, las crías de madres que durante la lactancia ingieren dieta de pescado presentan un menor peso y talla. A su vez, la apertura de ojos, la de oídos y la aparición de dientes se produce más tarde en las crías que ingieren la dieta de pescado, independientemente de la dieta que ingieran sus madres durante la gestación. En las pruebas de desarrollo psicomotor que aquí se han realizado, se detectan diferencias entre el grupo de crías que nacen y lactan de madres de oliva frente a las que nacen y lactan de madres del grupo de pescado. Sin embargo, no se detectan diferencias en los resultados de las pruebas entre las crías de madres que durante la gestación ingieren la dieta de pescado y que lactan de madres que ingieren la dieta de pescado (PEG-PEL) y las crías de madres que durante la gestación ingieren la dieta de pescado y lactan de madres que durante la lactancia ingieren la dieta de oliva (PEG-OL). Ello indicaría que aunque ligeramente, existe una influencia de la dieta de la madre durante la gestación sobre el desarrollo postnatal en las crías.

En cuanto a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol del plasma, hígado y cerebro de las crías, resulta que es clara y fuertemente dependiente del  $\alpha$ -tocoferol que les llega de la leche materna, pues no hay diferencias en ningún caso entre las crías que lactan de madres que toman la dieta de aceite de pescado, independientemente de la dieta que hubieran tomado las madres durante la gestación y tampoco la hay entre las que lactan de madres que toman la dieta de aceite de oliva.

Los resultados muestran que un exceso proporcional de ácidos grasos  $\omega$ -3 en la dieta producen una disminución del  $\alpha$ -tocoferol en el organismo, provocando una situación deficiente en este antioxidante tanto en la madre como en los fetos. La ingesta de aceite de pescado aumenta los requerimientos de vitamina E [602] y este aumento ha sido relacionado con una consecuencia del enriquecimiento en PUFA sobre la peroxidación lipídica [603]. Esta situación contrasta con la menor susceptibilidad a la peroxidación lipídica que ocurre cuando las ratas toman dietas suplementadas con aceite de oliva [604], permitiendo que las concentraciones endógenas de  $\alpha$ -tocoferol sean apropiadas, como hemos encontrado en nuestro estudio, tanto en las ratas preñadas como en sus fetos. A pesar de la menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol (y de ácido araquidónico) en los fetos de las ratas que durante la gestación se alimentaron con la dieta de aceite de pescado, el tamaño de la camada y el peso de los fetos no se vieron afectados. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores al someter a ratas durante la gestación

a distintas composiciones de la grasa de la dieta [605], e incluso a menor concentración de  $\alpha$ -tocoferol [606]. Estos resultados apoyan la idea de que durante la gestación en las ratas, ni cambios sustanciales en los ácidos grasos de la dieta ni una condición deficiente en antioxidantes afectan al éxito de la gestación, probablemente porque en estas especies una parte muy importante del desarrollo del tejido neuronal ocurre tras el nacimiento [607], como ocurre también en humanos [608]. En nuestro estudio esto se ve apoyado por el experimento del intercambio de crías, en el que las crías que nacen de madres que tomaron la dieta de pescado durante la gestación presentaron un ritmo de crecimiento postnatal y unos índices de maduración psicomotora similares a los de las madres que tomaron la dieta de oliva cuando se les permitió mamar de madres que tomaban la dieta de oliva.

La suplementación con vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol) en la dieta de las madres durante la gestación y la lactancia aumentó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma e hígado de las crías, pero no la modificó en el cerebro, en relación a la encontrada en las crías de los grupos de oliva. En humanos se ha observado que una suplementación con una gran cantidad de  $\alpha$ -tocoferol no aumenta la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el fluido cefalorraquídeo [609] y en ratas, la ingesta de  $\alpha$ -tocoferol incrementa sólo ligeramente la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el cerebro [610, 611], siendo el cambio mucho menor que en plasma u otros tejidos, incluido el hígado. En realidad, el reemplazo o la vida media de intercambio de  $\alpha$ -tocoferol en el sistema nervioso es mucho más lento que en el plasma [612] y el índice de captación de  $\alpha$ -tocoferol por el cerebro en ratones es muy bajo [613]. Además, el alto contenido en DHA en los fosfolípidos del cerebro en las crías de las ratas que tomaron la dieta de pescado suplementada con vitamina E pueden haber aumentado el consumo de antioxidantes y de esta forma haber impedido que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el cerebro de las crías de este grupo fuera superior al de las crías del grupo de oliva. Dado que la deficiencia en vitamina E tiene un papel en las alteraciones del metabolismo de monomanías en el cerebro de la rata [614], no hay forma de determinar si esta condición agrava la disfunción del sistema nervioso causada por el alterado perfil de ácidos grasos de estos animales. Sin embargo, el hecho de que la suplementación con  $\gamma$ -linolénico en la dieta de pescado incrementara el contenido en ácido araquidónico de los fosfolípidos del cerebro [601] y normalizara el peso corporal y las variables de maduración psicomotriz, a pesar de las bajas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, apoya el que la disponibilidad adecuada de ácido araquidónico sea más importante en el desarrollo postnatal que la disponibilidad de vitamina E.

### **6.2.3 Experimento 5: Destino del $\alpha$ -tocoferol en ratas diabéticas alimentadas con dietas de oliva, girasol y pescado suplementadas con vitamina E**

Con el objeto de estudiar la influencia del estrés oxidativo de la diabetes combinado con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, ratas hechas diabéticas con STZ se alimentaron con dietas con aceite de pescado (rica en ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3), aceite de girasol (poliinsaturados  $\omega$ -6) o con aceite de oliva (monoinsaturados). Las dietas se administraron durante tres semanas, pues previamente se había establecido que a las tres semanas de la administración de STZ se presenta un máximo en la concentración de TBARS y en la actividad de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa, en hígado y páncreas [377].

Durante el estudio se observó en los animales diabéticos la característica hiperfagia, que no se reflejó en una ganancia de peso, sino que al contrario, se acompañó de una disminución del peso corporal. Esta disminución de peso ya había sido observada previamente en el modelo de diabetes inducida por STZ a ratas [377, 381, 382, 416, 615-617], cuando no se trataba a los animales con insulina. A pesar de la disminución de peso global, el hígado de los animales diabéticos es mayor que en los controles. Esta hepatomegalia es otro de los síntomas descritos y conocidos de la diabetes inducida por STZ, que se produce por una hiperplasia inicial tras la administración de la droga y una menor apoptosis posterior, por lo que aumenta el número de células [618]. A su vez, observamos que las ratas no diabéticas alimentadas con dieta de pescado tienen un hígado mayor que las de oliva o girasol y que las diabéticas alimentadas con aceite de pescado presentan un hígado mayor que las de los otros dos grupos de diabéticas, aunque no encontramos evidencia de una interacción entre ambos factores. En ratas no diabéticas alimentadas con dietas ricas en aceite de pescado otros autores observaron un incremento en el tamaño del hígado [619], pero no se ha dado una explicación o justificación de este fenómeno.

El tamaño del tejido adiposo tras el ayuno es muy inferior en los animales diabéticos. Dado que la insulina disminuye la actividad de la HSL, aumenta la LPL endotelial, inhibe la movilización de FFA del tejido adiposo [330] y aumenta la expresión del receptor de LDL [345, 620], en esta situación de diabetes por STZ, en la que se produce una deficiencia insulínica, se desencadena una situación general de falta de acumulación de grasa junto a un estímulo de su movilización. Ello justifica este menor tamaño del tejido adiposo en los animales diabéticos. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre los pesos de los tejidos adiposos de los tres grupos de animales diabéticos (alimentados con la dieta de oliva, de girasol, o de pescado), hay que resaltar el que en los grupos alimentados con las dietas más ricas en PUFA (girasol y



pescado) se encontraron tres animales que no tenían nada de tejido adiposo apreciable, indicando una lipólisis muy activa y un depósito de grasa muy disminuido.

El ayuno en el que se mantiene a los animales durante 24 h no produce alteraciones visibles en los parámetros bioquímicos estudiados en las ratas controles, mientras que en las diabéticas se produce un cambio muy grande en su situación: los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol pasan tras el ayuno a niveles comparables a los controles. Esta “mejora” de la situación metabólica de las ratas diabéticas con el ayuno está lógicamente influida por la falta de sustratos tanto exógenos como endógenos. De hecho, sus escasas reservas grasas (puestas de manifiesto por el bajo peso del tejido adiposo lumbar) les impiden mantener esa elevada lipemia, lo cual supone un indudable beneficio para su cuadro metabólico.

Desde hace tiempo se sabe que la diabetes modifica la actividad de los sistemas de desaturación y afecta más a la  $\Delta 9$  desaturasa que a la  $\Delta 6$  desaturasa [621]. Pero en nuestro estudio no se puede establecer una tendencia tan clara en ese sentido porque en la dieta hay un aporte de determinados ácidos grasos que camuflan otras tendencias. El estudio detallado de la influencia combinada del tipo de grasa de la dieta en la IDDM sobre el metabolismo de los ácidos grasos requeriría haber valorado la distribución de ácidos grasos en más tejidos y en las distintas fracciones lipídicas. Hemos podido constatar, sin embargo, que la dieta produce variaciones en la distribución de ácidos grasos en el plasma: como era de esperar, en el plasma de las ratas alimentadas con la dieta de oliva, aumenta la proporción de ácido oleico, en el plasma de las de girasol, la proporción de linoleico y en las de pescado, las proporciones de eicosapentaenoico y docosahexaenoico. En estas últimas, además, disminuye la proporción de ácido araquidónico.

La diabetes produce un aumento de los ácidos grasos característicos de cada dieta, a expensas de una disminución en la proporción de los ácidos grasos saturados. Dado que estos ácidos grasos saturados provienen en gran medida de la síntesis endógena, esto podría indicar una menor actividad de los sistemas de lipogénesis, como de hecho se sabe que ocurre en la rata diabética por STZ [622].

La diabetes produce un incremento en el estrés oxidativo, como se ha indicado en la Introducción y en nuestro estudio esto se ve corroborado por el hecho de que los TBARS en plasma de las ratas diabéticas alimentadas están aumentados, al igual que había sido previamente descrito [378, 623, 624]. A su vez, el 8-IP en orina de 24h de las ratas diabéticas está aumentado. La determinación de los  $F_2$ -isoprostanos en general y del 8-IP en particular ha cobrado fuerza en los últimos tiempos como indicador de estrés oxidativo, pero sigue habiendo discrepancias en la literatura acerca de si es conveniente determinar la concentración de la forma libre en plasma, el total (libre y esterificado) en plasma o el total, que se encuentra en forma libre, en orina.

Bachi *et al* encontraron un incremento de 8-IP en la orina de 24 h de ratas diabéticas por STZ [625], pero Feillet-Coudray *et al* no encontraron diferencias en el 8-IP libre en plasma de ratas diabéticas y controles [378], mientras que Montero *et al* sí encontraron diferencias significativas entre ratas diabéticas y controles similares a las anteriores, tanto en la orina como en el 8-IP libre en plasma [626]. Hay que reseñar que los mismos autores que no encontraron diferencias en plasma, recientemente han publicado un estudio en el que encontraron una correlación negativa entre los niveles de 8-IP en orina y plasma en pacientes con diabetes tipo II [378]. Aunque parecen claramente establecidas las respectivas relaciones entre un mayor estrés oxidativo y la producción aumentada de 8-IP y entre la diabetes y un incremento del estrés oxidativo, faltan más estudios que determinen con mayor precisión la relación entre el grado de diabetes y las distintas posibilidades de determinación de 8-IP. En nuestro estudio decidimos cuantificarlo en orina, porque es una muestra muy sencilla de obtener y tratar, porque sólo se encuentra 8-IP en una forma (libre), porque la concentración en orina puede ser más alta que en plasma y además, porque es en orina donde en la literatura existen menos discrepancias acerca de la relación entre diabetes y aumento de 8-IP.

En cuanto a la relación de la determinación de 8-IP con la ingesta de las distintas dietas, parece existir una tendencia a que los niveles de 8-IP sean menores cuando los animales tomaban las dietas más ricas en ácidos grasos poliinsaturados (girasol y pescado) cuando se corrigen los resultados por la creatinina excretada y menores en el caso de los animales alimentados con la dieta de pescado si los resultados son expresados como cantidad total excretada. El efecto de los ácidos  $\omega$ -3 de la dieta disminuyendo la cantidad de 8-IP excretada ha sido observado también en humanos y aunque ha sido atribuido a una disminución del estrés oxidativo al consumir esta dieta [627, 628], no hay datos que sustenten este efecto protector de los ácidos grasos  $\omega$ -3 sobre el estrés oxidativo. Teniendo en cuenta que una dieta rica en  $\omega$ -3 disminuye la concentración de ácido araquidónico en todos los tejidos que nosotros hemos estudiado [601] y dado que el araquidónico es el único precursor de los prostanoïdes, podríamos atribuir a esta falta de precursor más que a una disminución en el estrés oxidativo la disminución en 8-IP que hemos observado en las ratas diabéticas alimentadas con dicha dieta rica en aceite de pescado. De hecho, nosotros esperábamos incluso menores niveles de 8-IP en la orina de las ratas alimentadas con dieta de pescado, precisamente como consecuencia de la disminución en el precursor de 8-IP, el ácido araquidónico. Teniendo en cuenta que los niveles de TBARS en el plasma de las ratas alimentadas con aceite de pescado son mayores que los de las ratas alimentadas con las dietas de aceite de oliva y de girasol, es posible que el mayor estrés oxidativo en las ratas alimentadas con dieta de pescado esté compensando la disminución en el precursor.

La concentración de hidroperóxidos, sin embargo, no se ve significativamente afectada, seguramente porque sólo fueron valorados tras las 24h de ayuno, cuando también los TBARS se ven normalizados a niveles equiparables a los de controles. En ratas diabéticas otros autores han encontrado niveles aumentados de hidroperóxidos lipídicos o lipoperóxidos en plasma [629-632], pero estos estudios se han realizado siempre en animales que estaban alimentados, por lo que no son comparables a la situación de ayuno aquí utilizada.

En nuestro experimento nos interesó desarrollar un método para medir el  $\alpha$ -tocoferol muy poco tiempo después de la extracción de la sangre, por lo que se optó por hacer una determinación en sangre total, antes de la separación de plasma y células sanguíneas. Acerca de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en sangre total no se han encontrado referencias en la literatura, existiendo sólo referencias a la evaluación por separado de la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y la concentración en eritrocitos y otras células sanguíneas. El contenido en  $\alpha$ -tocoferol se determinó en la sangre total tras las 24h de ayuno y se observó que tras el ayuno los niveles en plasma se igualan entre diabéticos y controles, pero en sangre total los niveles de  $\alpha$ -tocoferol de los tres grupos diabéticos es menor y menor aún en el grupo de pescado. Tras el ayuno de nuestro experimento, nosotros hemos observado que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de los animales controles disminuye aproximadamente un 40%, mientras que en el caso de los diabéticos disminuyen aproximadamente un 83%.

Como se ha indicado en la introducción, la IDDM sin controlar está asociada a una mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y un descenso en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos [566, 633]. Una disminución del contenido en  $\alpha$ -tocoferol en los eritrocitos parecida a la observada en el plasma, supondría la práctica desaparición del  $\alpha$ -tocoferol en eritrocitos. A partir de nuestros resultados hemos podido estimar el contenido en  $\alpha$ -tocoferol de los eritrocitos (teniendo en cuenta un valor aproximado de 40% para el hematocrito de las ratas) y hemos observado que, mientras que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en los eritrocitos de los controles no es menor que en su plasma correspondiente, en los diabéticos la práctica totalidad del  $\alpha$ -tocoferol en sangre tras el ayuno está en el plasma y la concentración en eritrocitos es casi nula.

Por otra parte, observamos que la dieta de aceite de pescado produce una disminución en los niveles en sangre total de  $\alpha$ -tocoferol, que resulta paralela a la disminución en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma de estas ratas. El que la dieta de pescado produzca una disminución en la concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol ha sido la tónica general observada en todas las situaciones experimentales estudiadas a lo largo de esta Tesis.

Uno de los propósitos de este experimento fue el estudiar la producción de productos de oxidación de  $\alpha$ -tocoferol en esta situación de estrés oxidativo y activo consumo de  $\alpha$ -tocoferol, como

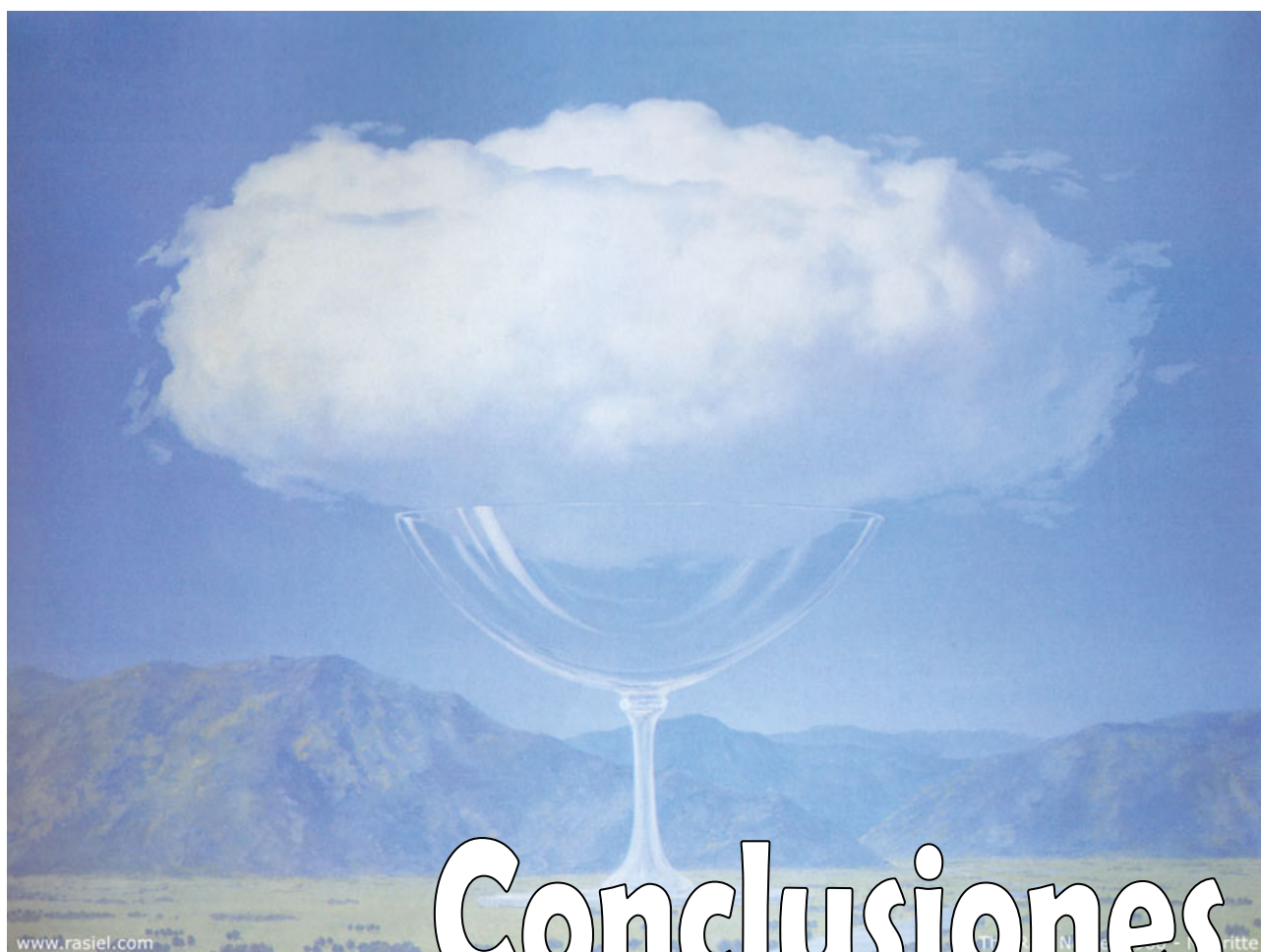
era la diabetes severa y la ingesta de dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados. Para ello, desarrollamos el método para poder cuantificar la concentración de los dos principales productos de oxidación del  $\alpha$ -tocoferol, la  $\alpha$ -tocoferol quinona y la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona. La concentración de  $\alpha$ -tocoferol quinona en plasma estaba descrito que era muy baja, menos de un 0.05% del  $\alpha$ -tocoferol plasmático [542], mientras que se podía esperar que los niveles de  $\alpha$ -tocoferol quinona en eritrocitos fueran significativamente mayores, del orden de 10 a 30% del  $\alpha$ -tocoferol en estas células [634]. Por ello y porque el método se puso a punto y validó en un rango de concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol quinona cuyo límite inferior era 10 veces menor que el descrito, esperábamos poder detectar la  $\alpha$ -tocoferol quinona sin problemas en sangre total. Acerca de la  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona sólo existía información previa sobre su concentración en tejidos [161]. No obstante lo anterior, cuando se trataba la muestra correctamente con un complejante de cationes como el EDTA, observamos que los niveles de ambos productos de oxidación, en caso de que estuvieran presentes, lo estaban por debajo de los límites de cuantificación del ensayo. Este complejante de cationes no estaba presente en los métodos empleados anteriormente [542, 568, 635], por lo que pensamos que es posible que estos investigadores hayan generado la  $\alpha$ -tocoferol quinona en el tratamiento experimental, que incluye saponificación y adición de antioxidantes. En nuestra experiencia, los antioxidantes empleados normalmente no son suficientes para prevenir la aparición de la  $\alpha$ -tocoferol quinona y se hace necesaria la presencia del EDTA para conseguirlo. En condiciones nativas, los cationes inorgánicos no están libres, sino en estructuras proteicas como la ceruloplasmina o la hemoglobina, pero cuando dichas proteínas son desnaturalizadas, los cationes quedan libres y el EDTA cumple la función de complejarlos para impedir que den lugar a reacciones como la de Fenton.

En cuanto a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en hígado, el aumento en hígado de ratas diabéticas observado previamente [378] no se reprodujo en nuestro experimento, aunque sí observamos que la cantidad total estimada de  $\alpha$ -tocoferol en el hígado de los animales diabéticos alimentados con la dieta de oliva y de pescado es mayor que en sus respectivos controles, mientras que en el caso de los animales diabéticos alimentados con la dieta de girasol no hay diferencias entre diabéticos y controles. Hay que tener en cuenta que los animales se sacrificaron tras el ayuno y que las reservas de lípidos en estos animales estaban muy disminuidas, por lo que el  $\alpha$ -tocoferol que pudiera estar presente en los depósitos grasos del animal se habría movilizado a lo largo de las 24h de ayuno.

En el caso del  $\alpha$ -tocoferol en tejido adiposo, observamos que, aunque la cantidad total almacenada no era distinta entre diabéticos y no diabéticos, la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el adiposo de los animales diabéticos era muy superior a la de los controles. Este hecho resulta seguramente por la activa lipólisis que se produce en este tejido en ausencia de insulina, de manera que existe una salida muy activa de FFA a la circulación. Estos resultados indican que, así

como la captación de  $\alpha$ -tocoferol en el tejido adiposo se produce conjuntamente con la de ácidos grasos libres (a través de la actividad LPL) y con la de triglicéridos (a través de los receptores de lipoproteínas), los mecanismos, hasta la fecha desconocidos, de salida de  $\alpha$ -tocoferol del tejido adiposo no están ligados a los mecanismos de salida de FFA de este tejido a la circulación.









## 7 CONCLUSIONES

- En la presente Tesis hemos desarrollado, puesto a punto y validado la metodología para la cuantificación de  $\alpha$ -tocoferol en las siguientes matrices: tejido adiposo, glándula mamaria, aceites alimentarios, dietas experimentales y sangre total. A su vez, hemos desarrollado métodos para la determinación de  $\alpha$ -tocoferol quinona y  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona en sangre total. Todos los métodos han sido aplicados a los experimentos realizados con ratas.

En lo que hace referencia a los resultados obtenidos con animales experimentales, podemos extraer las conclusiones que consideramos más relevantes:

- Aunque se ha descrito que en la gestación incrementa el estrés oxidativo, nosotros hemos observado que salvo algunas excepciones producidas por el tipo de dieta, la rata gestante presenta en plasma unos niveles de  $\alpha$ -tocoferol superiores a los de la rata virgen. Esta diferencia desaparece cuando los datos se corrigen por los de lípidos circulantes (cociente  $\alpha$ -tocoferol / [triglicéridos + colesterol]), de forma que ese incremento que se observa en la rata gestante en los niveles de  $\alpha$ -tocoferol son el reflejo de su hiperlipidemia. Tampoco viene acompañado por un cambio sustancial en la concentración y/o contenido de  $\alpha$ -tocoferol en los tejidos (hígado o tejido adiposo).
- Una variación en la cantidad de grasa en la dieta de los animales afecta poco a la concentración plasmática o tisular de  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, el tipo de grasa sí que afecta a este parámetro, de manera que la dieta conteniendo aceite de palma tiende a producir una concentración plasmática y hepática de  $\alpha$ -tocoferol superior a los otros tipos de grasa, en particular en el caso de las ratas gestantes. A su vez, la dieta conteniendo aceite de pescado causa una importante reducción en la concentración (o cantidad) de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, hígado y tejido adiposo, siendo este efecto especialmente manifiesto con el mayor porcentaje de grasa en la dieta utilizado (10%). Puesto que esta reducción en los depósitos endógenos de  $\alpha$ -tocoferol no se puede asociar a un menor contenido en la dieta, puede concluirse que sea el resultado de su mayor consumo como consecuencia del elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en esta dieta.
- En el caso de las ratas gestantes, la dieta conteniendo aceite de pescado también produce una importante reducción en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la placenta y en el hígado de los fetos. Estos cambios son dependientes de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma materno, como lo muestran las correlaciones significativas observadas entre las

respectivas concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en placenta e hígado fetal frente a la del plasma materno.

- Durante la gestación, la dieta conteniendo aceite de pescado, en comparación con la de aceite de oliva, produce también una importante depleción de  $\alpha$ -tocoferol en plasma y cerebro fetales. A su vez, cuando estos tratamientos se mantienen durante la lactancia, dicha dieta de aceite de pescado produce un importante retraso en el desarrollo corporal y psicomotor de las crías y al final de la lactancia (día 21 de edad) estas crías muestran una concentración de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, hígado y cerebro mucho mas baja que la de las crías de las ratas con dieta de aceite de oliva. Dichas crías de madres lactantes alimentadas con dieta de aceite de pescado también presentan una reducción en la proporción de ácido araquidónico en plasma y en fosfolípidos cerebrales.
- Mediante experimentos de suplementación con acetato de  $\alpha$ -tocoferol, ácido araquidónico o ácido  $\gamma$ -linolénico como precursor del ácido araquidónico, hemos demostrado que es la deficiencia en ácido araquidónico más que la de  $\alpha$ -tocoferol la principal responsable del retraso en el desarrollo postnatal de las crías de madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado.
- Mediante experimentos de intercambio de crías al nacer entre madres que ingieren dietas diferentes, podemos también concluir que la ingestión de un exceso de ácidos grasos poliinsaturados (dieta de aceite de pescado) durante la lactancia influye más en el desarrollo postnatal de las crías que cuando la madre la ingiere durante la gestación. A su vez, la producción de leche y la concentración en la leche de  $\alpha$ -tocoferol son mucho mas bajas en las ratas alimentadas con dieta de aceite de pescado que las de aceite de oliva y lógicamente estos dos efectos (malnutrición y deficiencia de  $\alpha$ -tocoferol en la leche) deben también contribuir al retraso postnatal de las crías lactadas de madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado.
- La diabetes severa producida por estreptozotocina en la rata incrementa la concentración plasmática de TBARS y este efecto es mucho mas acusado en las ratas alimentadas con la dieta de aceite de pescado, que produce un importante incremento en los niveles circulantes de ácidos grasos  $\omega$ -3 que en las ratas alimentadas con dieta de aceite de oliva o de aceite de girasol. A pesar de que estos resultados indican un incremento del estrés oxidativo en las ratas diabéticas, sus niveles de  $\alpha$ -tocoferol en plasma son más altos que los de las ratas controles y este cambio se produce en paralelo con un incremento también en los niveles circulantes de triglicéridos y de colesterol. En consecuencia, el cociente  $\alpha$ -tocoferol/ (triglicéridos + colesterol) no se modifica con la diabetes

y ello pone de manifiesto que los niveles circulantes de  $\alpha$ -tocoferol son más dependientes de los lípidos plasmáticos que del grado de estrés oxidativo de los animales.

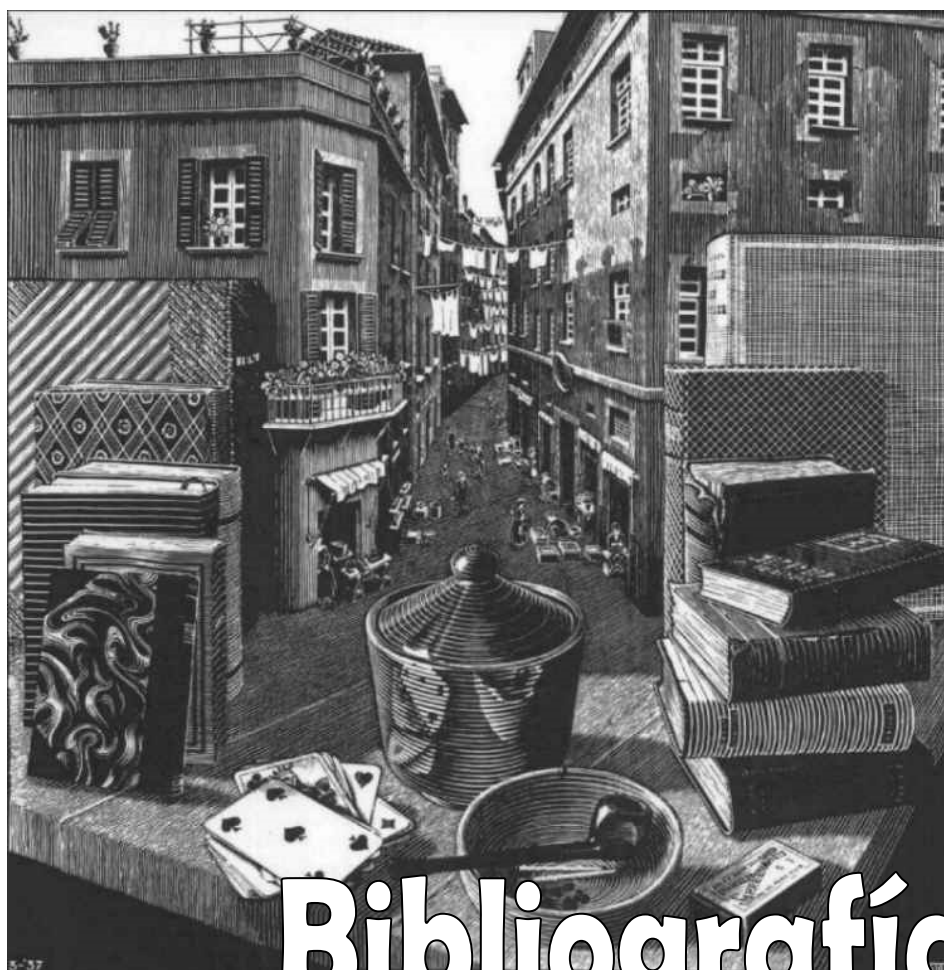
- En ayunas, la excreción urinaria de 8-isoprostano es más alta en las ratas diabéticas que en sus controles, siendo este efecto independiente del tipo de dieta a la que habían estado sometidas. Sin embargo, en el caso de las ratas diabéticas alimentadas con la dieta de aceite de pescado, la reducción en su porcentaje de ácido araquidónico circulante hace sospechar que impide una mayor producción de 8-isoprostano, como correspondería a su elevado índice de estrés oxidativo. En este caso, al finalizar las 24 h de ayuno, las ratas diabéticas sí presentaban una disminución significativa de los niveles circulantes de  $\alpha$ -tocoferol, al tiempo que manifestaban unos bajos niveles circulantes de triglicéridos y de colesterol, los cuales ya no diferían con los de las ratas controles. Sin embargo, la concentración (o cantidad) hepática de  $\alpha$ -tocoferol aumentó en las ratas diabéticas alimentadas con dieta de aceite de oliva o de pescado y la concentración en tejido adiposo aumentó en las ratas alimentadas con dieta de aceite de oliva o de girasol.

## 7.1 Consideraciones finales

Del conjunto de los resultados aquí presentados podemos destacar tres aspectos que nos parecen importantes:

- A. Los niveles circulantes de  $\alpha$ -tocoferol dependen más de los lípidos plasmáticos que de su disponibilidad en la dieta.
- B. Un exceso de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, como es el caso de la dieta de aceite de pescado, produce una depleción circulante y tisular de  $\alpha$ -tocoferol, que supone un importante incremento del riesgo de desencadenar un estrés oxidativo en situaciones susceptibles a ello, como es el caso de la gestación o la diabetes.
- C. La importante depleción de  $\alpha$ -tocoferol que se produce en las crías de madres alimentadas con la dieta de aceite de pescado no es directamente responsable de su retrasado desarrollo, aunque lógicamente coloca a estos animales en importante riesgo de una mayor susceptibilidad de sufrir patologías dependientes del estrés oxidativo.





# Bibliografía



## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Suplementos de Vitamina E. <http://www.formatotal.com/compras/expandir.php?idcategoria=18>
- 2 Koller, T. La Vitamina E. Para piel sana y músculos tonificados. <http://cuerpodiet.com/vitaminas/2001-vitaminaE.htm>
- 3 Diplock AT, Xu G-L, et al. Relationship of tocopherol structure to biological activity, tissue uptake, and prostaglandin biosynthesis, en Diplock AT, Machlin LJ, et al., (Eds.) *Vitamin E Biochemistry and health implications*, N Y Acad Sci, New York, 1989, p. 72-84.
- 4 Evans HM y Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*, 1922, 56: 650-651
- 5 Evans HM y Burr GO. The anti-sterility vitamin fat soluble E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1925, 11: 334-341
- 6 Evans HM, Emerson OH y Emerson GA. The isolation from wheat-germ oil of an alcohol, alpha-tocopherol, having the properties of vitamin E. *J Biol Chem*, 1936, 113: 319-332
- 7 Emerson OH, Emerson GA, et al. The chemistry of vitamin E. Tocopherols from various sources. *J Biol Chem*, 1937, 122: 99-107
- 8 Traber MG, Pillai SR, et al. Vitamin E deficiency in dogs does not alter preferential incorporation of RRR-alpha-tocopherol compared with all rac-alpha-tocopherol into plasma. *Lipids*, 1993, 28(12): 1107-1112
- 9 Veris. The role of antioxidants in diabetes. <http://www.veris-online.org>
- 10 Veris. Vitamin E Fact Book. <http://www.veris-online.org>
- 11 Papas A y Vos E. Vitamin E, cancer, and apoptosis. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73(6): 1113-1114
- 12 Jiang Q, Christen S, et al. gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(6): 714-722
- 13 Devaraj S y Traber MG. gamma-Tocopherol, the new vitamin E? *Am J Clin Nutr*, 77(3): 530-531.
- 14 Bieri JG. Comments on the new dietary reference intake for vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75(4): 781
- 15 Traber MG. Reply to JG Bieri. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75(4): 781-782.
- 16 Burton GW, Traber MG, et al. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67(4): 669-684
- 17 Vatassery GT, Bauer T y Dysken M. High doses of vitamin E in the treatment of disorders of the central nervous system in the aged. *Am J Clin Nutr*, 1999, 70(5): 793-801
- 18 Vatassery GT, Bauer T y Dysken M. Reply to HJ Kayden and T Wisniewski. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(1): 202-203
- 19 Horwitt MK. Critique of the requirement for vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73(6): 1003-1005
- 20 Traber, Maret G. Human vitamin E requirements: Is  $\alpha$ -tocopherol the only form that is required? Congreso: Micronutrients and Health: Molecular Biological Mechanisms (July 27-30, 2000, Langkawi, Malasia), p. 376-382. 2001.

- 21 Traber MG. Vitamin E: too much or not enough? *Am J Clin Nutr*, 2001, 73(6): 997-998
- 22 Cohn W. Evaluation of vitamin E potency. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(1): 156-158
- 23 Burton GW, Ingold KU, et al. Evaluation of vitamin E potency: reply to W Cohn. *Am J Clin Nutr*, 1999, 69(1): 157-158
- 24 Kayden HJ y Wisniewski T. On the biological activity of vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(1): 201-203
- 25 Traber MG. The bioavailability bugaboo. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(5): 1029-1030
- 26 Bunyan J, McHale D, et al. Biological potencies of  $\epsilon$ - y  $\zeta_1$ -tocopherol and 5-methyltocol. *Br J Nutr*, 1961, 15: 253-257
- 27 Weiser H, Vecchi M y Schlachter M. Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. IV. USP units and alpha-tocopherol equivalents of all-rac-, 2-ambo- and RRR-alpha-tocopherol evaluated by simultaneous determination of resorption-gestation, myopathy and liver storage capacity in rats. *Int J Vitam Nutr Res*, 1986, 56(1): 45-56
- 28 National Research Council. *Recommended dietary allowances*, National Academy Press, Washington, D.C., 1989.
- 29 Acuff RV, Thedford SS, et al. Relative bioavailability of RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60(3): 397-402
- 30 Kiyose C, Muramatsu R, et al. Biodiscrimination of alpha-tocopherol stereoisomers in humans after oral administration. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65(3): 785-789
- 31 Traber MG, Rader D, et al. Vitamin E dose-response studies in humans with use of deuterated RRR-alpha-tocopherol. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(4): 847-853
- 32 Traber MG, Elsner A y Brigelius-Flohe R. Synthetic as compared with natural vitamin E is preferentially excreted as alpha-CEHC in human urine: studies using deuterated alpha-tocopheryl acetates. *FEBS Lett*, 1998, 437(1-2): 145-148
- 33 Food & Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamins.  
[http://www.iom.edu/iom/iomhome.nsf/WFiles/webtablevitamins/\\$file/webtablevitamins.pdf](http://www.iom.edu/iom/iomhome.nsf/WFiles/webtablevitamins/$file/webtablevitamins.pdf)
- 34 Nanji AA, Sadrzadeh SM, et al. Dietary saturated fatty acids: a novel treatment for alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 1995, 109(2): 547-554
- 35 Mathias PM, Harries JT, et al. Studies on the in vivo absorption of micellar solutions of tocopherol and tocopheryl acetate in the rat: demonstration and partial characterization of a mucosal esterase localized to the endoplasmic reticulum of the enterocyte. *J Lipid Res*, 1981, 22(5): 829-837
- 36 Halliwell B y Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: a radical chain reaction, en Halliwell B y Gutteridge JMC, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford: Clarendon Press, New York, 1989, p. 188-210.
- 37 Rosenau T y Habicher WD. Vitamin CE, a novel prodrug form of vitamin E. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1997, 45: 1080-1084
- 38 Traber MG, Schiano TD, et al. Efficacy of water-soluble vitamin E in the treatment of vitamin E malabsorption in short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr*, 1994, 59(6): 1270-1274
- 39 Burton GW, Joyce A, e Ingold KU. First prove that vitamin E is major lipid-soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*, 1982, 7: 327



- 40 Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(4 Suppl): 1050S-1055S
- 41 Wang X y Quinn PJ. The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol Membr Biol*, 2000, 17(3): 143-156
- 42 Hope WC, Dalton C, et al. Influence of dietary vitamin E on prostaglandin biosynthesis in rat blood. *Prostaglandins*, 1975, 10: 557-567
- 43 Hartmann R, Steiner R, et al. The effect of the kallikrein-kinin system and prostaglandins E on the motility of human spermatozoa measured by the laser-Doppler method. *Adv Exp Med Biol*, 1979, 120B: 311-316
- 44 Steiner M y Anastasi J. Vitamin E. An inhibitor of the platelet release reaction. *J Clin Invest*, 1976, 57(3): 732-727
- 45 Traber MG y Packer L. Vitamin E: beyond antioxidant function. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6 Suppl): 1501S-1509S
- 46 Azzi A y Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res*, 2000, 39(3): 231-55
- 47 Ozer NK y Azzi A. Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology*, 2000, 148(2-3): 179-185
- 48 Azzi A, Breyer I, et al. Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *J Nutr*, 2000, 130(7): 1649-1652
- 49 Wu D, Hayek MG y Meydani S. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J Nutr*, 2001, 131(2): 382S-388S
- 50 Appleby SB, Ristimaki A, et al. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, 1994, 302(Pt 3): 723-727
- 51 Schreck R, Albermann K y Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*, 1992, 17(4): 221-237
- 52 Boscoboinik D, Szewczyk A, et al. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*, 1991, 266(10): 6188-6194
- 53 Boscoboinik D, Szewczyk A y Azzi A. Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 286(1): 264-269
- 54 Azzi A, Boscoboinik D y Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem*, 1992, 208(3): 547-557
- 55 Chatelain E, Boscoboinik DO, et al. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1176(1-2): 83-89
- 56 Boscoboinik D, Chatelain E, et al. Molecular basis of alpha-tocopherol inhibition of smooth muscle cell proliferation in vitro. *EXS*, 1992, 62: 164-167
- 57 Tasinato A, Boscoboinik D, et al. d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(26): 12190-12194
- 58 Devaraj S, Li D y Jialal I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J*

- Clin Invest*, 1996, 98(3): 756-763
- 59 Devaraj S, Adams-Huet B, et al. Dose-response comparison of RRR-alpha-tocopherol and all-racemic alpha-tocopherol on LDL oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(10): 2273-2279
  - 60 Devaraj S y Jialal I. The effects of alpha-tocopherol on critical cells in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 1998, 9(1): 11-15
  - 61 Freedman JE, Farhat JH, et al. alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation*, 1996, 94(10): 2434-2440
  - 62 Kanno T, Utsumi T, et al. Inhibition of stimulus-specific neutrophil superoxide generation by alpha-tocopherol. *Free Radic Res*, 1995, 22(5): 431-440
  - 63 Koya D, Lee IK, et al. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(3): 426-435
  - 64 Tada H, Ishii H y Isogai S. Protective effect of D-alpha-tocopherol on the function of human mesangial cells exposed to high glucose concentrations. *Metabolism*, 1997, 46(7): 779-784
  - 65 Walters-Laporte E, Furman C, et al. A high concentration of melatonin inhibits in vitro LDL peroxidation but not oxidized LDL toxicity toward cultured endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, 32(4): 582-592
  - 66 Cachia O, Benna JE, et al. alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*, 1998, 273(49): 32801-32805
  - 67 Kunisaki M, Bursell SE, et al. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes*, 1994, 43(11): 1372-1377
  - 68 Kunisaki M, Fumio U, et al. Vitamin E normalizes diacylglycerol-protein kinase C activation induced by hyperglycemia in rat vascular tissues. *Diabetes*, 1996, 45 Suppl 3: S117-S119
  - 69 Ricciarelli R, Tasinato A, et al.  $\alpha$ -Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J*, 1998, 334: 243-249
  - 70 Ricciarelli R y Azzi A. Regulation of recombinant PKC alpha activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 355(2): 197-200
  - 71 Clement S, Tasinato A, et al. The effect of alpha-tocopherol on the synthesis, phosphorylation and activity of protein kinase C in smooth muscle cells after phorbol 12- myristate 13-acetate down-regulation. *Eur J Biochem*, 1997, 246(3): 745-749
  - 72 Azzi A, Boscoboinik D, et al. Vitamin E mediated response of smooth muscle cell to oxidant stress. *Diabetes Res Clin Pract*, 1999, 45(2-3): 191-198
  - 73 Prasad KN, Gaudreau D y Brown J. Binding of vitamin E in mammalian tumor cells in culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1981, 166(2): 167-174
  - 74 Dutta Roy AK, Leishman DJ, et al. Identification of a low molecular mass (14.2 kDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196(3): 1108-1112
  - 75 Yoshida H, Yusin M, et al. Identification, purification, and immunochemical characterization of a tocopherol-binding protein in rat liver cytosol. *J Lipid Res*, 1992, 33(3): 343-350
  - 76 Leishman DJ, Campbell FM, et al. A low molecular weight (12-15kDa) protein fraction in rat liver

- binds alpha-tocopherol. *Biochem Soc Trans*, 1993, 21(4): 408S
- 77 Gordon MJ, Campbell FM, et al. Characterization of a novel alpha-tocopherol-binding protein from bovine heart cytosol. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 318(1): 140-146
- 78 Dutta Roy AK, alpha-Tocopherol-binding proteins: purification and characterization, *Meth Enzymol*, 1997, 232: 278-297.
- 79 Zimmer S, Stocker A, et al. A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25672-25680
- 80 Kitabchi AE y Wimalasena J. Demonstration of specific binding sites for 3H-RRR-alpha-tocopherol on human erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1982, 393: 300-314
- 81 Kitabchi AE y Wimalasena J. Specific binding sites for D-alpha-tocopherol on human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 684(2): 200-206
- 82 Kitabchi AE, Wimalasena J y Barker J. Specific receptor sites for alpha-tocopherol in purified isolated adrenocortical cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980, 96(4): 1739-1746
- 83 Dutta Roy AK. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of alpha-tocopherol: role of tocopherol-binding proteins. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(9-10): 967-971
- 84 Kunisaki M, Umeda F, et al. Vitamin E restores reduced prostacyclin synthesis in aortic endothelial cells cultured with a high concentration of glucose. *Metabolism*, 1992, 41(6): 613-621
- 85 Kunisaki M, Umeda F, et al. Vitamin E binds to specific binding sites and enhances prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Thromb Haemost*, 1992, 68(6): 744-751
- 86 Patnaik RN y Nair PP. Studies on the binding of d-alpha-tocopherol to rat liver nuclei. *Arch Biochem Biophys*, 1977, 178(2): 333-341
- 87 Guarnieri C, Flamigni F y Caldarera CM. A possible role of rabbit heart cytosol tocopherol binding in the transfer of tocopherol into nuclei. *Biochem J*, 1980, 190(2): 469-471
- 88 Porter TD. Supernatant protein factor and tocopherol-associated protein: an unexpected link between cholesterol synthesis and vitamin E (review). *J Nutr Biochem*, 2003, 14(1): 3-6
- 89 Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*, 1994, 91(2-3): 133-140
- 90 Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, 300(2): 535-543
- 91 Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994, 344: 721-724
- 92 Boveris A y Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 1973, 134(3): 707-716
- 93 Boveris A, Cadenas E y Stoppani AO. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*, 1976, 156(2): 435-44
- 94 Turrens JF y Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 1980, 191(2): 421-427
- 95 McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 2000, 108(8): 652-659
- 96 Li Y, Huang TT, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking man-

- ganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 1995, 11(4): 376-381
- 97 Babior BM, Kipnes RS y Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*, 1973, 52(3): 741-744
- 98 Markert M, Andrews PC y Babior BM. Measurement of  $O_2^-$  production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 358-365
- 99 Dinauer MC y Orkin SH. Chronic granulomatous disease. *Annu Rev Med*, 1992, 43: 117-124
- 100 Chance B, Sies H y Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, 59(3): 527-605
- 101 Puntarulo S, Galleano M, et al. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1074(2): 277-283
- 102 Evans PJ, Evans RW, et al. Metal ions catalytic for free radical reactions in the plasma of patients with fulminant hepatic failure. *Free Radic Res*, 1994, 20(3): 139-144
- 103 Evans PJ y Halliwell B. Measurement of iron and copper in biological systems: bleomycin and copper-phenanthroline assays. *Methods Enzymol*, 1994, 233: 82-92
- 104 Halliwell B y Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 1994, 102 Suppl 10: 5-12
- 105 Buettner GR y Jurkiewicz BA. Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14(1): 49-55
- 106 Radi R, Bush KM, et al. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 286(1): 117-125
- 107 Radi R, Beckman JS, et al. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 288(2): 481-487
- 108 Palmer RM, Ferrige AG y Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327(6122): 524-526
- 109 Violi F, Marino R, et al. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15(4): 283-288
- 110 Frankel EN. Recent advances in lipid oxidation. *J Sci Food Agric*, 1991, 54(4): 459-511
- 111 Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*, 2000, 49(2 Suppl 1): 3-8
- 112 Roberts LJ y Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1345(2): 121-135
- 113 Morrow JD y Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res*, 1997, 36(1): 1-21
- 114 Obata T, Tomaru K, et al. Smoking and oxidant stress: assay of isoprostane in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2000, 746(1): 11-15
- 115 Morrow JD, Frei B, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*, 1995, 332(18): 1198-1203
- 116 Souvignet C, Cracowski JL, et al. Are isoprostanes a clinical marker for antioxidant drug investigation? *Fundam Clin Pharmacol*, 2000, 14(1): 1-10

- 117 Sodergren E, Cederberg J, et al. Vitamin E supplementation decreases basal levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin f(2alpha) in rats. *J Nutr*, 2000, 130(1): 10-14
- 118 Migliavacca E, Carrupt PA y Testa B. Theoretical parameters to characterize antioxidants. Part 1. The case of vitamin E and analogs. *Helv Chim Acta*, 1997, 80(5): 1613-1626
- 119 Yamauchi R, Yagi Y y Kato K. Isolation and characterization of addition products of alpha-tocopherol with peroxy radicals of dilinoleoylphosphatidylcholine in liposomes [published erratum appears in *Biochim Biophys Acta* 1995 Jan 20;1254(2):227]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1212(1): 43-49
- 120 Burton GW, Joyce A y Ingold JU. Is vitamin E the only lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem and Biophys*, 1983, 221: 281-290
- 121 Mergens WJ. Efficacy of vitamin E to prevent nitrosamine formation. *Ann N Y Acad Sci*, 1982, 393: 61-69
- 122 Serbinova EA y Packer L. Antioxidant properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 354-366.
- 123 Wagner BA, Buettner GR y Burns CP. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 334(2): 261-267
- 124 Christen S., Woodall AA, et al.  $\gamma$ -Tocopherol traps mutagenic electrophils such as NO<sub>x</sub> and complements  $\alpha$ -tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94: 3217-3222
- 125 Hoglen NC, Waller SC, et al. Reactions of peroxy nitrite with gamma-tocopherol. *Chem Res Toxicol*, 1997, 10(4): 401-407
- 126 Wolf G y Carpenter KJ. Early research into the vitamins: the work of Wilhelm Stepp. *J Nutr*, 1997, 127(7): 1255-1259
- 127 Kagan VE y Packer L. Light-induced generation of vitamin E radicals: assessing vitamin E regeneration. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 316-320
- 128 Lambelet P, Saucy F y Loliger J. Chemical evidence for interactions between vitamins E and C. *Experientia*, 1985, 41(11): 1384-1388
- 129 Stahl W y Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, 1997, 46 Suppl 2: S14-S18
- 130 Niki E, Noguchi N, et al. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6 Suppl): 1322S-1326S
- 131 Aruoma OI, Smith C, et al. Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by beta-blockers and by agents that interfere with calcium metabolism. A physiologically-significant process? *Biochem Pharmacol*, 1991, 42(4): 735-743
- 132 Chan AC, Tran K, et al. Regeneration of vitamin E in human platelets. *J Biol Chem*, 1991, 266(26): 17290-17295
- 133 Ho CT y Chan AC. Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes. *FEBS Lett*, 1992, 306(2-3): 269-272
- 134 Parkkila S, Niemela O, et al. Vitamin E decreases hepatic levels of aldehyde-derived peroxidation products in rats with iron overload. *Am J Physiol*, 1996, 270(2 Pt 1): G376-G384

- 135 Vuchetich PJ, Bagchi D, et al. Naphthalene-induced oxidative stress in rats and the protective effects of vitamin E succinate. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21(5): 577-590
- 136 Hirano K, Ogihara T, et al. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol. *Free Radic Res*, 1994, 21(5): 267-276
- 137 Cadenas S, Rojas C, et al. Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, 27(11): 1175-1181
- 138 Vatassery GT. Oxidation of alpha-tocopherol in subcellular fractions from rat brain and its possible involvement in nerve function. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(11): 2295-2301
- 139 Vatassery GT, Quach HT, et al. Analysis of hydroxy and keto cholesterols in oxidized brain synaptosomes. *Lipids*, 1997, 32(1): 101-107
- 140 Schweich MD, Lison D y Lauwerys R. The role of vitamin E in the susceptibility of rat lung and liver microsomes to iron-stimulated peroxidation. *Environ Res*, 1995, 70(1): 62-69
- 141 Isliker H, Weiser H y Moser U. Stabilization of rat heart mitochondria by alpha-tocopherol in rats. *Int J Vitam Nutr Res*, 1997, 67(2): 91-94
- 142 Tirmenstein MA, Watson BW, et al. Sensitive method for measuring tissue alpha-tocopherol and alpha-tocopheryloxybutyric acid by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J Chromatogr B*, 1998, 707(1-2): 308-311
- 143 Palozza P, Calviello G, et al. Supplementation with canthaxanthin affects plasma and tissue distribution of alpha- and gamma-tocopherols in mice. *J Nutr*, 1998, 128(11): 1989-1994
- 144 Bartoli GM, Palozza P, et al. n-3 PUFA and alpha-tocopherol control of tumor cell proliferation. *Mol Aspects Med*, 1993, 14(3): 247-252
- 145 Ozer NK, Palozza P, et al. d-alpha-Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1993, 322(3): 307-310
- 146 Trostler N, Brady PS, et al. Influence of dietary vitamin E on malondialdehyde levels in liver and adipose tissue and on glutathione peroxidase and reductase activities in liver and erythrocytes of lean and obese (ob/ob) mice. *J. Nutr.*, 1979, 109: 345-352
- 147 Cadenas S, Lertsiri S, et al. Phospholipid hydroperoxides and lipid peroxidation in liver and plasma of ODS rats supplemented with alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Free Radic Res*, 1996, 24(6): 485-493
- 148 Rojas C, Cadenas S, et al. Endotoxin depletes ascorbate in the guinea pig heart. Protective effects of vitamins C and E against oxidative stress. *Life Sci*, 1996, 59(8): 649-657
- 149 Rojas C, Cadenas S, et al. Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21(7): 907-915
- 150 Sodergren E, Cederberg J, et al. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur J Nutr*, 2001, 40(1): 10-16
- 151 Meagher EA, Barry OP, et al. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA*, 2001, 285(9): 1178-1182
- 152 Awad JA, Morrow JD, et al. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F2-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem*, 1993, 268(6): 4161-4169
- 153 Liebler DC, Kaysen KL y Kennedy TA. Redox cycles of vitamin E: hydrolysis and ascorbic acid

- dependent reduction of 8a-(alkyldioxy)tocopherones. *Biochemistry (Mosc)*, 1989, 28(25): 9772-9777
- 154 Liebler DC, Kaysen KL y Burr JA. Peroxyl radical trapping and autoxidation reactions of alpha-tocopherol in lipid bilayers. *Chem Res Toxicol*, 1991, 4(1): 89-93
- 155 Liebler DC y Burr JA. Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. *Biochemistry (Mosc)*, 1992, 31(35): 8278-8284
- 156 Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol*, 1993, 23(2): 147-169
- 157 Liebler DC. Tocopherone and epoxytocopherone products of vitamin E oxidation. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 310-316
- 158 Ham AJ y Liebler DC. Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 339(1): 157-164
- 159 Hughes PE y Tove SB. Identification of deoxy-alpha-tocopherolquinol as another endogenous electron donor for biohydrogenation. *J Biol Chem*, 1980, 255(24): 11802-11806
- 160 Hughes PE y Tove SB. Identification of an endogenous electron donor for biohydrogenation as alpha-tocopherolquinol. *J Biol Chem*, 1980, 255(10): 4447-4452
- 161 Hughes PE y Tove SB. Synthesis of alpha-tocopherolquinone by the rat and its reduction by mitochondria. *J Biol Chem*, 1980, 255(15): 7095-7097
- 162 Hayashi T, Kanetoshi A, et al. Reduction of alpha-tocopherolquinone to alpha-tocopherolhydroquinone in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44(3): 489-493
- 163 Siegel D, Bolton EM, et al. The reduction of alpha-tocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharmacol*, 1997, 52(2): 300-305
- 164 Moore ANJ y Ingold KU.  $\alpha$ -Tocopheryl quinone is converted into vitamin E in man. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22(5): 931-934
- 165 Van Houte H, De Hoffmann E, et al. Oxidative catabolism of alpha-tocopherol in rat liver microsomes. *Lipids*, 2001, 36(4): 367-372
- 166 Bowry VW, Ingold KU y Stocker R. Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J*, 1992, 288(Pt 2): 341-344
- 167 Bowry VW, Mohr D, et al. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1995, 270(11): 5756-5763
- 168 Ingold KU, Bowry VW, et al. Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(1): 45-49
- 169 Waldeck AR y Stocker R. Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9(6): 954-964
- 170 Thomas SR, Neuzil J, et al. Coantioxidants make alpha-tocopherol an efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6 Suppl): 1357S-1364S
- 171 Thomas SR y Stocker R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for

- atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(12): 1795-1805
- 172 Viana M, Castro M, et al. Effect of different doses of vitamin E on the incidence of malformations in pregnant diabetic rats. *Ann Nutr Metab*, 2003, 47(1): 6-10
- 173 Bjorneboe A, Bjorneboe GE, et al. Secretion of alpha-tocopherol from cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 922(2): 199-205
- 174 Bjorneboe A, Bjorneboe GE, et al. Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 889(3): 310-315
- 175 Kayden HJ y Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*, 1993, 34(3): 343-358
- 176 Traber MG, Goldberg I, et al. Vitamin E uptake by human intestinal cells during lipolysis in vitro. *Gastroenterology*, 1990, 98(1): 96-103
- 177 Gallo-Torres HE. Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E. *Lipids*, 1970, 5(4): 379-384
- 178 Gallo-Torres HE. Intestinal absorption and lymphatic transfer of (+)-3,4-[3H2]-.alpha.-tocopheryl nicotinate in the rat. *Internat Z Vitaminforsch*, 1970, 40(4): 505-514
- 179 Sokol RJ, Heubi JE, et al. The mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenterology*, 1983, 85: 1172-1182
- 180 Sokol RJ, Farrell MK, et al. Comparison of vitamin E and 25-hydroxyvitamin D absorption during childhood cholestasis. *J Pediatr*, 1983, 103(5): 712-717
- 181 Sokol RJ, Bove KE, et al. Vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis: presence of sural nerve lesion prior to 2 1/2 years of age. *J Pediatr*, 1983, 103(2): 197-204
- 182 Kelleher J y Losowsky MS. The absorption of alpha-tocopherol in man. *Br J Nutr*, 1970, 24(4): 1033-1047
- 183 MacMahon MT y Neale G. The absorption of alpha-tocopherol in control subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Clin Sci*, 1970, 38(2): 197-210
- 184 Traber MG, Kayden HJ, et al. Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in thoracic duct-cannulated rats. *Am J Clin Nutr*, 1986, 44(6): 914-923
- 185 Dimitrov NV, Meyer C, et al. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(3): 723-729
- 186 Roodenburg AJ, Leenen R, et al. Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(5): 1187-1193
- 187 Brink EJ, Haddeman E y Tijburg LB. Vitamin E incorporated into a very-low-fat meal is absorbed from the intestine of young rats. *Br J Nutr*, 1996, 75(6): 939-948
- 188 Tijburg LB, Haddeman E, et al. Dietary linoleic acid at high and reduced dietary fat level decreases the faecal excretion of vitamin E in young rats. *Br J Nutr*, 1997, 77(2): 327-336
- 189 Gallo-Torres HE, Weber F y Wiss O. Effect of different dietary lipids on the lymphatic appearance of vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res*, 1971, 41(4): 504-515
- 190 Argiles J y Herrera E. Appearance of circulating and tissue <sup>14</sup>C-lipids after oral <sup>14</sup>C-tripalmitate administration in the late-pregnant rat. *Metabolism*, 1989, 38: 104-108



- 191 Martínez S, Barbas C y Herrera E. Uptake of alpha-tocopherol by the mammary gland but not by white adipose tissue is dependent on lipoprotein lipase activity around parturition and during lactation in the rat. *Metabolism*, 2002, 51(11): 1444-1451
- 192 Bjorneboe GE, Bjorneboe A, et al. Reduced hepatic alpha-tocopherol content after long-term administration of ethanol to rats. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 918(3): 236-241
- 193 Bjorneboe A, Bjorneboe GE y Drevon CA. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr*, 1990, 120(3): 233-242
- 194 Traber MG, Ingold KU, et al. Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R-alpha-tocopherol in human lipoproteins. *Lipids*, 1988, 23(8): 791-797
- 195 Lichtenstein AH, Hachey DL, et al. Measurement of human apolipoprotein B-48 and B-100 kinetics in triglyceride-rich lipoproteins using. *J Lipid Res*, 1992, 33(6): 907-914
- 196 Hussain MM, Kancha RK, et al. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1300(3): 151-170
- 197 Yan LJ, Traber MG y Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem*, 1995, 228(2): 349-351
- 198 Traber MG. Regulation of human plasma vitamin E. *Adv Pharmacol*, 1997, 38: 49-63
- 199 Traber MG y Arai H. Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 1999, 19: 343-355
- 200 Brigelius-Flohe R y Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 1999, 13(10): 1145-1155
- 201 Carrero P, Gomez-Coronado D, et al. Binding of lipoprotein lipase to apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1299(2): 198-206
- 202 Castillo F y Cárdenas J, en. Estructura, metabolismo y función de las vitaminas liposolubles, en Herrera E, *Bioquímica*, McGraw-Hill-Interamericana de España, 1994, p. 761-809.
- 203 Massey JB. Kinetics of transfer of alpha-tocopherol between model and native plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 793(3): 387-392
- 204 Granot E, Tamir I y Deckelbaum RJ. Neutral lipid transfer protein does not regulate alpha-tocopherol transfer between human plasma lipoproteins. *Lipids*, 1988, 23(1): 17-21
- 205 Traber MG, Lane JC, et al. Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids*, 1992, 27(9): 657-663
- 206 Bjornson LK, Kayden HJ, et al. The transport of alpha-tocopherol and beta-carotene in human blood. *J Lipid Res*, 1976, 17(4): 343-352
- 207 Behrens WA, Thompson JN y Madere R. Distribution of alpha-tocopherol in human plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr*, 1982, 35(4): 691-696
- 208 Brin MF, Fetell MR, et al. Blind loop syndrome, vitamin E malabsorption, and spinocerebellar degeneration. *Neurology*, 1985, 35(3): 338-342
- 209 Carr TP, Traber MG, et al. Interrelationships of alpha-tocopherol with plasma lipoproteins in African green monkeys: effects of dietary fats. *J Lipid Res*, 1993, 34(11): 1863-1871
- 210 Catignani GL y Bieri JG. Rat liver alpha-tocopherol binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 497(2): 349-357

- 211 Sato Y, Hagiwara K, et al. Purification and characterization of the alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS Lett*, 1991, 288(1-2): 41-45
- 212 Kaplowitz N, Yoshida H, et al. Tocopherol-binding proteins of hepatic cytosol. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 570: 85-94
- 213 Kuhlenkamp J, Ronk M, et al. Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein. *Protein Expr Purif*, 1993, 4(5): 382-389
- 214 Traber MG, Rudel LL, et al. Nascent VLDL from liver perfusions of cynomolgus monkeys are preferentially enriched in RRR- compared with SRR-alpha-tocopherol: studies using deuterated tocopherols. *J Lipid Res*, 1990, 31(4): 687-694
- 215 Traber MG, Burton GW, et al. RRR- and SRR-alpha-tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR-alpha-tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1990, 31(4): 675-685
- 216 Arita M, Nomura K, et al. alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(23): 12437-12441
- 217 Traber MG, Sokol RJ, et al. Impaired discrimination between stereoisomers of alpha-tocopherol in patients with familial isolated vitamin E deficiency. *J Lipid Res*, 1993, 34(2): 201-210
- 218 Traber MG, Sokol RJ, et al. Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J-Clin-Invest*, 1990, 85(2): 397-407
- 219 Leonard SW, Terasawa Y, et al. Incorporation of deuterated RRR- or all-rac.-alpha.-tocopherol in plasma and tissues of .alpha.-tocopherol transfer protein-null mice. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75(3): 555-560
- 220 Hosomi A, Arita M, et al. Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett*, 1997, 409(1): 105-108
- 221 Hatam LJ y Kayden HJ. The failure of alpha-tocopherol supplementation to alter the distribution of lipoprotein cholesterol in normal and hyperlipoproteinemic persons. *Am J Clin Pathol*, 1981, 76(1): 122-126
- 222 Jialal I y Grundy SM. Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1992, 33(6): 899-906
- 223 Jishage K-I, Arita M, et al. alpha-Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 1669-1672
- 224 Sato Y, Arai H, et al. Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *J Biol Chem*, 1993, 268(24): 17705-17710
- 225 Arita M, Sato Y, et al. Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J*, 1995, 306(Pt 2): 437-443
- 226 Roma MG, Stone V, et al. Vasopressin-induced disruption of actin cytoskeletal organization and canalicular function in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of protein kinase C. *Hepatology*, 1998, 28(4): 1031-1041
- 227 Kaufman SS, Lyden ER, et al. Disaccharidase activities and fat assimilation in pediatric patients after intestinal transplantation. *Transplantation*, 2000, 69(3): 362-365
- 228 Cohn W, Loechleiter F y Weber F. Alpha-tocopherol is secreted from rat liver in very low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1988, 29(10): 1359-1366

- 229 Herrera E. Metabolismo de la vitamina E. *Nutrición y Obesidad*, 2000, 3: 4-16
- 230 Traber MG, Olivecrona T y Kayden HJ. Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro. *J Clin Invest*, 1985, 75(5): 1729-1734
- 231 Sattler W, Levak Frank S, et al. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase in transgenic mice results in increased alpha-tocopherol levels in skeletal muscle. *Biochem. J.*, 1996, 318(1): 15-19
- 232 Traber MG, Burton GW, et al. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*, 1992, 33(8): 1171-1182
- 233 Kayden HJ, Hatam LJ y Traber MG. The measurement of nanograms of tocopherol from needle aspiration biopsies of adipose tissue: normal and abetalipoproteinemic subjects. *J Lipid Res*, 1983, 24(5): 652-656
- 234 Traber MG y Kayden HJ. Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr*, 1987, 46(3): 488-495
- 235 Brown MS, Herz J y Goldstein JL. LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature*, 1997, 388(6643): 629-630
- 236 Traber MG y Kayden HJ. Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*, 1984, 40(4): 747-751
- 237 Dietschy JM, Kita T, et al. Cholesterol synthesis in vivo and in vitro in the WHHL rabbit, an animal with defective low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res*, 1983, 24(4): 469-480
- 238 Cohn W y Kuhn H. The role of the low density lipoprotein receptor for alpha-tocopherol delivery to tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 570: 61-71
- 239 de Deckere EA, Korver O, et al. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur J Clin Nutr*, 1998, 52(10): 749-753
- 240 Galli C y Butrum R. Dietary omega 3 fatty acids and cancer: an overview. *World Rev Nutr Diet*, 1991, 66: 446-461
- 241 Horwitt MK. Vitamin E and lipid metabolism in man. *Am J Clin Nutr*, 1960, 8: 451-461
- 242 Witting LA y Horwitt MK. Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *J Nutr*, 1964, 82: 19-33
- 243 Harris PL y Embree ND. Quantitative consideration of the effect of polyunsaturated fatty acid content of the diet upon the requirements for vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 1963, 13: 385
- 244 Bieri JG y Evarts RP. Tocopherols and fatty acids in American diets. The recommended allowance for vitamin E. *J Am Diet Assoc*, 1973, 62(2): 147-151
- 245 Bieri JG. Influence of dietary fat level and dietary tocopherols on plasma tocopherols of human subjects. *J Nutr*, 1978, 108(7): 1207-1209
- 246 Bieri JG, Thorp SL y Tolliver TJ. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on tissue vitamin E status. *J. Nutr.*, 1978, 108(3): 392-398
- 247 Horwitt MK. Status of human requirements for vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 1974, 27(10): 1182-1193
- 248 Farwer SR, der Boer BC, et al. The vitamin E nutritional status of rats fed on diets high in fish oil, linseed oil or sunflower seed oil. *Br J Nutr*, 1994, 72(1): 127-145

- 249 Valk EE y Hornstra G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int J Vitam Nutr Res*, 2000, 70(2): 31-42
- 250 McGuire SO, Alexander DW y Fritsche KL. Fish oil source differentially affects rat immune cell alpha-tocopherol concentration. *J Nutr*, 1997, 127(7): 1388-1394
- 251 Alexander DW, McGuire SO, et al. Fish oils lower rat plasma and hepatic, but not immune cell  $\alpha$ -tocopherol concentration. *J. Nutr.*, 1995, 125: 2640-2649
- 252 McKenzie GG, McKenzie JB y McColum EU. Uncomplicated vitamin E deficiency in the rabbit and its relation to toxicity of cod liver oil. *J. Nutr. Sci.* 1941, 21: 225-234,
- 253 Muggli R. Physiological requirements of vitamin E as a function of the amount and type of polyunsaturated fatty acid. *World Rev Nutr Diet*, 1994, 75: 166-168
- 254 Meydani M, Natiello F, et al. Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J. Nutr.*, 1991, 121: 484-491
- 255 Brown JE y Wahle KW. Effect of fish-oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole-blood aggregation in man. *Clin Chim Acta*, 1990, 193(3): 147-156
- 256 Nair PP, Judd JT, et al. Dietary fish oil-induced changes in the distribution of alpha-tocopherol, retinol, and beta-carotene in plasma, red blood cells, and platelets: modulation by vitamin E. *Am J Clin Nutr*, 1993, 58(1): 98-102
- 257 Herrera E, Lasunción MA, et al. en. Lipid metabolic interactions in the mother during pregnancy and their fetal repercussions., en Cuezva JM y et al., *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*, Plenum Press, New York, 1990, p. 213-230.
- 258 Herrera E, Lasunción MA, et al. Placental transport of freefatty acids, glycerol and ketone bodies, en Polin R y et al., *Fetal and neonatal physiology*, W.B. Saunders, Philadelphia, EE.UU., 1992, p. 291-298.
- 259 López-Luna P, Bernardo R, et al. en. Influencia del ejercicio y la gestación sobre parámetros del estrés oxidativo en rata, *Tomo Extraordinario: 125 Aniversario de la RSEHN*, Real Sociedad Española de Historia Natural, Madrid, 1996, p. 47-49.
- 260 Herrera E, Lasuncion MA, et al. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 158(6 Pt 2): 1575-1583
- 261 Ludeña MC, Mena MA, et al. Effects of alcohol ingestion in the pregnant rat on daily food intake, offspring growth and metabolic parameters. *Gen. Pharmacol.*, 1983, 14: 327-332
- 262 Herrera E, Lasunción MA, et al. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes*, 1991, 40(Suppl. 2): 83-88
- 263 Palacin M, Lasuncion MA, et al. Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism*, 1991, 40(5): 534-539
- 264 Bonet B y Herrera E. Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology*, 1988, 122(2): 450-455
- 265 Bonet B y Herrera E. Maternal hypothyroidism during the first half of gestation compromises normal catabolic adaptations of late gestation in the rat. *Endocrinology*, 1991, 129(1): 210-216
- 266 Knopp RH, Herrera E y Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. *J. Clin. Invest.*, 1970, 49: 1438-1446

- 267 Herrera E, Lasunción MA, et al. en. Carbohydrate-lipid interactions in pregnancy., en Herrera E y et al., *Perinatal biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, 1992, p. 1-18.
- 268 Martin A y Herrera E. Different responses to maternal diabetes during the first and second half of gestation in the streptozotocin-treated rat. *Isr J Med Sci*, 1991, 27(8-9): 442-448
- 269 Ramírez I, Llobera M y Herrera E. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism*, 1983, 32: 333-341
- 270 Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta*, 2002, 23 Suppl A: S9-19
- 271 Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*, 2000, 54 Suppl 1: S47-S51
- 272 Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine*, 2002, 19(1): 43-55
- 273 Herrera E y Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev*, 2000, 16(3): 202-210
- 274 Ramos P y Herrera E. Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am J Physiol*, 1995, 269(5 Pt 1): E858-E863
- 275 Bonet B, Chait A, et al. Metabolism of modified LDL by cultured human placental cells. *Atherosclerosis*, 1995, 112(2): 125-136
- 276 Alvarez JJ, Montelongo A, et al. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lipid Res*, 1996, 37(2): 299-308
- 277 Herrera E. Metabolismo lipídico durante la gestación. *Ars Pharmaceutica*, 1996, 37(4): 871-887
- 278 Herrera E y Munilla MÁ, Maternal lipid metabolism and its implications for fetal growth, en Frederick C. Battaglia, *Placental Function and Fetal Nutrition*, Nestlé Ltd. Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A., 1997, p. 169-182.
- 279 Chihara H, Otsubo Y, et al. Basal metabolic rate in hyperemesis gravidarum: comparison to normal pregnancy and response to treatment. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 188(2): 434-438
- 280 Halliwell B y Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 1990, 186: 1-85
- 281 Gitto E, Reiter RJ, et al. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate*, 2002, 81(3): 146-157
- 282 Sugino N, Nakamura Y, et al. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil*, 1993, 97(2): 347-351
- 283 Mover-Lev H y Ar A. Changes in enzymatic antioxidant activity in pregnant rats exposed to hyperoxia or hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1997, 118(3): 353-359
- 284 Shimamura K, Sugino N, et al. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J Reprod Fertil*, 1995, 105(2): 253-257
- 285 Sainz RM, Reiter RJ, et al. Changes in lipid peroxidation during pregnancy and after delivery in rats: effect of pinealectomy. *J Reprod Fertil*, 2000, 119: 143-149
- 286 Walsh SW. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertens. Pregnancy*, 1994, 13: 1-32

- 287 Qanungo S, Sen A y Mukherjea M. Antioxidant status and lipid peroxidation in human fetoplacental unit. *Clin Chim Acta*, 285(1-2): 1-12.
- 288 Sprecher H. An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1999, 2(2): 135-138
- 289 Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, et al. Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. *Clin Perinatol*, 1999, 26(2): 335-359
- 290 Carnielli VP, Wattimena DJ, et al. The very low birth weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr Res*, 1996, 40(1): 169-174
- 291 Szitanyi P, Koletzko B, et al. Metabolism of <sup>13</sup>C-labeled linoleic acid in newborn infants during the first week of life. *Pediatr Res*, 1999, 45(5 Pt 1): 669-673
- 292 Emken EA. Metabolism of dietary stearic acid relative to other fatty acids in human subjects. *Am J Clin Nutr*, 1994, 60(6 Suppl): 1023S-1028S
- 293 Emken EA, Adlof RO y Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1213(3): 277-288
- 294 Sauerwald TU, Hachey DL, et al. Effect of dietary alpha-linolenic acid intake on incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids into plasma phospholipids of term infants. *Lipids*, 1996, 31 Suppl: S131-S135
- 295 Gibson RA y Makrides M. n-3 polyunsaturated fatty acid requirements of term infants. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(Suppl 1): 251S-255S
- 296 Clandinin MT, Chappell JE y van Aerde JE. Requirements of newborn infants for long chain polyunsaturated fatty acids. *Acta Paediatr Scand Suppl*, 1989, 351: 63-71
- 297 Farquharson J, Cockburn F, et al. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet*, 1992, 340(8823): 810-813
- 298 Makrides M y Gibson RA. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(Suppl 1): 307S-311S
- 299 Makrides M, Neumann MA y Gibson RA. Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. *Eur J Clin Nutr*, 1996, 50(6): 352-357
- 300 Makrides M, Neumann MA, et al. A randomized trial of different ratios of linoleic to alpha-linolenic acid in the diet of term infants: effects on visual function and growth. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(1): 120-129
- 301 Makrides M, Neumann MA, et al. A critical appraisal of the role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on neural indices of term infants: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*, 2000, 105(1 Pt 1): 32-38
- 302 van Houwelingen AC, Foreman-van Drongelen MM, et al. Essential fatty acid status of fetal plasma phospholipids: similar to postnatal values obtained at comparable gestational ages. *Early Hum Dev*, 1996, 46(1-2): 141-152
- 303 Combs GF, Garbisu C, et al. Bioavailability of selenium accumulated by selenite-reducing bacteria. *Biol Trace Elem Res*, 1996, 52(3): 209-225
- 304 Berghaus TM, Demmelmair H y Koletzko B. Fatty acid composition of lipid classes in maternal and cord plasma at birth. *Eur J Pediatr*, 1998, 157(9): 763-768

- 305 Dutta Roy AK. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(1 Suppl): 315S-322S
- 306 Otto SJ, Houwelingen AC, et al. Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study. *Eur J Clin Nutr*, 1997, 51(4): 232-242
- 307 Luukkainen P, Salo MK, et al. Fatty acid composition of plasma and red blood cell phospholipids in preterm infants from 2 weeks to 6 months postpartum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995, 20(3): 310-315
- 308 Steenvoorden DP y Beijersbergen van Henegouwen G. Protection against UV-induced systemic immunosuppression in mice by a single topical application of the antioxidant vitamins C and E. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75(6): 747-755
- 309 Genzel-Boroviczeny O, Wahle J y Koletzko B. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur J Pediatr*, 1997, 156(2): 142-147
- 310 Demmelmair H, Baumheuer M, et al. Metabolism of U13C-labeled linoleic acid in lactating women. *J Lipid Res*, 1998, 39(7): 1389-1396
- 311 Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res*, 1991, 30(1): 39-103
- 312 Bourre JM, Francois M, et al. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr*, 1989, 119(12): 1880-1892
- 313 Wainwright PE, Huang YS, et al. The effects of dietary n-3/n-6 ratio on brain development in the mouse: a dose response study with long-chain n-3 fatty acids. *Lipids*, 1992, 27(2): 98-103
- 314 Yonekubo A, Kanno T, et al. Effects of dietary fish oil on polyunsaturated fatty acid desaturation in fetal and postnatal rats. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58(5): 802-806
- 315 Perichon R, Bourre JM, et al. The role of peroxisomes in aging. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(7): 641-652
- 316 Guesnet P, Alasnier C, et al. Modifying the n-3 fatty acid content of the maternal diet to determine the requirements of the fetal and suckling rat. *Lipids*, 1997, 32(5): 527-34
- 317 Johnson L. Vitamin nutrition in the fetus and newborn, en Polin RA y Fox WW, (eds.) *Fetal and neonatal physiology*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1998, p. 425-442.
- 318 Machlin LJ. *Vitamin E, a comprehensive treatise*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1980.
- 319 Herrera E, Palacin M, et al. Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes*, 1985, 34(Suppl 2): 42-46
- 320 Lasuncion MA, Lorenzo J, et al. Maternal factors modulating nutrient transfer to fetus. *Biol Neonate*, 1987, 51(2): 86-93
- 321 Lasuncion MA, Testar X, et al. Method for the study of metabolite transfer from rat mother to fetus. *Biol Neonate*, 1983, 44(2): 85-92
- 322 Leger CL, Dumontier C, et al. A short term supplementation of pregnant women before delivery does not improve significantly the vitamin E status of neonates. Low efficiency of the vitamin E placental transfer. *Int J Vitam Nutr Res*, 1998, 68(5): 293-299
- 323 Yeum KJ, Ferland G, et al. Relationship of plasma carotenoids, retinol and tocopherols in mothers and newborn infants. *J Am Coll Nutr*, 1998, 17(5): 442-447
- 324 Kiely M, Cogan PF, et al. Concentrations of tocopherols and carotenoids in maternal and cord

- blood plasma. *Eur J Clin Nutr*, 1999, 53(9): 711-715
- 325 Acuff RV, Dunworth RG, et al. Transport of deuterium-labeled tocopherols during pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67(3): 459-464
- 326 Schenker S, Yang Y, et al. Antioxidant transport by the human placenta. *Clin Nutr*, 1998, 17(4): 159-167
- 327 Mino M, Kasugai O y Nagita A. Relationship between red blood cell and liver tocopherol concentration after administration and depletion of vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res*, 1985, 55(1): 47-51
- 328 Mino M, Miki M, et al. Nutritional assessment of vitamin E in oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1989, 570: 296-310
- 329 Herrera E, Munoz C, et al. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Braz J Med Biol Res*, 1994, 27(11): 2499-2519
- 330 González Santos P, Herrera Pombo JL, et al. Dislipemia diabética: Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Av Diabetol*, 1998, 14(1): 33-43
- 331 Ganda OP, Rossini AA y Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*, 1976, 25(7): 595-603
- 332 Ward DT, Yau SK, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(4): 779-790
- 333 Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*, 1987, 28(6): 613-628
- 334 Reaven EP y Reaven GM. Mechanisms for development of diabetic hypertriglyceridemia in streptozotocin-treated rats. Effect of diet and duration of insulin deficiency. *J Clin Invest*, 1974, 54(5): 1167-1178
- 335 O'Looney P, Vander Maten M y Vahouny GV. Insulin-mediated modifications of myocardial lipoprotein lipase and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 1983, 258(21): 12994-3001
- 336 Braun JE y Severson DL. Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by decavanadate but not insulin. *Am J Physiol*, 1992, 262(5 Pt 1): E663-E670
- 337 Liu L y Severson DL. Endothelial binding sites for lipoprotein lipase are not diminished in perfused hearts from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996, 74(11): 1204-1209
- 338 Rodrigues B, Braun JE, et al. Regulation of lipoprotein lipase activity in cardiac myocytes from control and diabetic rat hearts by plasma lipids. *Can J Physiol Pharmacol*, 1992, 70(9): 1271-1279
- 339 Tavangar K, Murata Y, et al. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J Clin Invest*, 1992, 90(5): 1672-1678
- 340 Braun JE y Severson DL. Diabetes reduces heparin- and phospholipase C-releasable lipoprotein lipase from cardiomyocytes. *Am J Physiol*, 1991, 260(3 Pt 1): E477-E485
- 341 Ewart HS, Carroll R y Severson DL. Lipoprotein lipase activity in rat cardiomyocytes is stimulated by insulin and dexamethasone. *Biochem J*, 1997, 327((Pt 2)): 439-442
- 342 Ewart HS, Carroll R y Severson DL. Lipoprotein lipase activity is stimulated by insulin and dexamethasone in cardiomyocytes from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1999, 77(8): 571-578
- 343 Ewart HS y Severson DL. Insulin and dexamethasone stimulation of cardiac lipoprotein lipase activity involves the actin-based cytoskeleton. *Biochem J*, 1999, 340(Pt 2): 485-490



- 344 Redgrave TG y Callow MJ. The effect of insulin deficiency on the metabolism of lipid emulsion models of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats. *Metabolism*, 1990, 39(1): 1-10
- 345 Swami S, Sztalryd C y Kraemer FB. Effects of streptozotocin-induced diabetes on low density lipoprotein receptor expression in rat adipose tissue. *J Lipid Res*, 1996, 37(2): 229-236
- 346 Bar-On H, Chen YD y Reaven GM. Evidence for a new cause of defective plasma removal of very low density lipoproteins in insulin-deficient rats. *Diabetes*, 1981, 30(6): 496-499
- 347 Verschoor L, Chen YD y Reaven GM. Why does experimental insulin deficiency lead to a decrease in removal of very low density-triglyceride from plasma? *Horm Metab Res*, 1984, 16(2): 88-91
- 348 Saheki S, Hitsumoto Y, et al. In vitro degradation of very low density lipoprotein from diabetic patients by lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta*, 1993, 217(2): 105-114
- 349 Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16(3): 383-391
- 350 Jones AF, Winkles JW, et al. Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. *Diabetes Res*, 1988, 7(2): 89-92
- 351 Tilton RG, Kawamura T, et al. Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*, 1997, 99(9): 2192-2202
- 352 Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991, 40(4): 405-412
- 353 Otero P, Herrera E y Bonet B. Dual effect of glucose on LDL oxidation: dependence on vitamin E. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(8): 1133-1140
- 354 Sundaram RK, Bhaskar A, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Colch)*, 1996, 90(4): 255-260
- 355 Nourooz Zadeh J, Rahimi A, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*, 1997, 40(6): 647-653
- 356 Leonhardt W, Hanefeld M, et al. Impact of concentrations of glycated hemoglobin, alpha-tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type II diabetes and control subjects. *Clin Chim Acta*, 1996, 254(2): 173-186
- 357 Tsai EC, Hirsch IB, et al. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes*, 1994, 43(8): 1010-1014
- 358 Jennings PE, Chirico S, et al. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes Res*, 1987, 6(3): 151-154
- 359 Karpen CW, Cataland S, et al. Production of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and vitamin E status in platelets from type I human diabetic subjects. *Diabetes*, 1985, 34(6): 526-531
- 360 Paolisso G, D'Amore A, et al. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism*, 1994, 43(11): 1426-1429
- 361 Olmedilla B, Granado F, et al. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem*, 1997, 43(6 Pt 1): 1066-1071
- 362 Maxwell SR y Lip GY. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. *Br J Clin Pharmacol*, 1997, 44(4): 307-17

- 363 Dyer RG, Stewart MW, et al. 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin Chim Acta*, 1997, 260(1): 1-13
- 364 Sinclair AJ, Girling AJ, et al. Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation. *Diabetologia*, 1991, 34(3): 171-175
- 365 Srinivasan KN, Pugalendi KV, et al. Diabetes mellitus, lipid peroxidation and antioxidant status in rural patients. *Clin Chim Acta*, 1997, 259(1-2): 183-186
- 366 Leinonen J, Lehtimäki T, et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1997, 417(1): 150-152
- 367 Velazquez E, Winocour PH, et al. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabet Med*, 1991, 8(8): 752-758
- 368 Nishigaki I, Hagihara M, et al. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med*, 1981, 25(3): 373-378
- 369 Altomare E, Vendemiale G, et al. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metab*, 1992, 18(4): 264-271
- 370 Jennings PE, Jones AF, et al. Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diabet Med*, 1987, 4(5): 452-456
- 371 Haffner SM, Agil A, et al. Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and NIDDM. *Diabetes Care*, 1995, 18(5): 646-653
- 372 Davi G, Ciabattoni G, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F2 alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*, 1999, 99(2): 224-229
- 373 Dandona P, Thusu K, et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 1996, 347(8999): 444-445
- 374 Gopaul NK, Anggard EE, et al. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non- insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1995, 368(2): 225-229
- 375 Nourooz Zadeh J, Tajaddini Sarmadi J, et al. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, 1995, 44(9): 1054-1058
- 376 Jenkins AJ, Klein RL, et al. LDL from patients with well-controlled IDDM is not more susceptible to in vitro oxidation. *Diabetes*, 1996, 45(6): 762-767
- 377 Kakkar R, Mantha SV, et al. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 1998, 94(6): 623-632
- 378 Feillet-Coudray C, Chone F, et al. Divergence in plasmatic and urinary isoprostane levels in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 2002, 324(1-2): 25-30
- 379 Rosen P, Nawroth PP, et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*, 2001, 17(3): 189-212
- 380 Nath N, Chari SN y Rathi AB. Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes*, 1984, 33(6): 586-589
- 381 Thompson KH y Godin DV. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr*

- Res, 1995, 15(9): 1377-1410
- 382 Thompson KH, Godin DV y Lee M. Tissue antioxidant status in streptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary manganese deficiency. *Biol Trace Elem Res*, 1992, 35(3): 213-224
- 383 Reaven P. Dietary and pharmacologic regimens to reduce lipid peroxidation in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6 Suppl): 1483S-1489S
- 384 Reaven PD, Herold DA, et al. Effects of Vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. *Diabetes Care*, 1995, 18(6): 807-816
- 385 Fuller CJ, Chandalia M, et al. RRR-alpha-tocopheryl acetate supplementation at pharmacologic doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(5): 753-759
- 386 Borcea V, Nourooz Zadeh J, et al. alpha-Lipoic acid decreases oxidative stress even in diabetic patients with poor glycemic control and albuminuria. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(11-12): 1495-1500
- 387 Haffner SM. Oxidative stress: introduction. *Metabolism*, 2000, 49(2 Suppl 1): 1-2
- 388 Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism*, 2000, 49(2 Suppl 1): 30-34
- 389 Gallou G, Ruelland A, et al. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*, 1993, 214(2): 227-234
- 390 Hartnett ME, Stratton RD, et al. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 2000, 23(2): 234-240
- 391 Vessby J, Basu S, et al. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *J Intern Med*, 2002, 251(1): 69-76
- 392 De Caterina R, Caprioli R, et al. n-3 fatty acids reduce proteinuria in patients with chronic glomerular disease. *Kidney Int*, 1993, 44(4): 843-850
- 393 Gao W, Connor HD, et al. Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new, antioxidant-insensitive free radical species. *Transplantation*, 1995, 59(5): 674-679
- 394 Rossing P, Hansen BV, et al. Fish oil in diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 1996, 19(11): 1214-1219
- 395 Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, et al. A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. Mayo Nephrology Collaborative Group. *N Engl J Med*, 1994, 331(18): 1194-1199
- 396 Hendra TJ, Britton ME, et al. Effects of fish oil supplements in NIDDM subjects. Controlled study. *Diabetes Care*, 1990, 13(8): 821-829
- 397 Popp-Snijders C, Schouten JA, et al. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res*, 1987, 4(3): 141-147
- 398 Schectman G, Kaul S y Kissebah AH. Effect of fish oil concentrate on lipoprotein composition in NIDDM. *Diabetes*, 1988, 37(11): 1567-173
- 399 Borkman M, Chisholm DJ, et al. Effects of fish oil supplementation on glucose and lipid metabolism in NIDDM. *Diabetes*, 1989, 38(10): 1314-1319
- 400 Friday KE, Childs MT, et al. Elevated plasma glucose and lowered triglyceride levels from ome-

- ga-3 fatty acid supplementation in type II diabetes. *Diabetes Care*, 1989, 12(4): 276-281
- 401 Wahlqvist ML, Lo CS y Myers KA. Fish intake and arterial wall characteristics in healthy people and diabetic patients. *Lancet*, 1989, 2(8669): 944-946
- 402 Glauber H, Wallace P, et al. Adverse metabolic effect of omega-3 fatty acids in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 1988, 108(5): 663-668
- 403 Stacpoole PW, Alig J, et al. Lipodystrophic diabetes mellitus. Investigations of lipoprotein metabolism and the effects of omega-3 fatty acid administration in two patients. *Metabolism*, 1988, 37(10): 944-51
- 404 Stacpoole PW, Alig J, et al. Dose-response effects of dietary marine oil on carbohydrate and lipid metabolism in normal subjects and patients with hypertriglyceridemia. *Metabolism*, 1989, 38(10): 946-56
- 405 Kasim SE, Stern B, et al. Effects of omega-3 fish oils on lipid metabolism, glycemic control, and blood pressure in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 67(1): 1-5
- 406 Harris WS, Connor WE, et al. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *J Lipid Res*, 1990, 31(9): 1549-5158
- 407 Harris WS, Connor WE, et al. Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism*, 1984, 33(11): 1016-1019
- 408 Ventura MA, Woollett LA y Spady DK. Dietary fish oil stimulates hepatic low density lipoprotein transport in the rat. *J Clin Invest*, 1989, 84(2): 528-537
- 409 Fasching P, Ratheiser K, et al. Metabolic effects of fish-oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*, 1991, 40(5): 583-589
- 410 Storlien LH, Kraegen EW, et al. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science*, 1987, 237(4817): 885-888
- 411 Hamazaki T, Nakamura N y Kobayashi M. Effect of intravenous administration of docosahexaenoic acid emulsion on blood glucose and insulin concentrations in diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 683: 207-212
- 412 Karpen CW, Cataland S, et al. Interrelation of platelet vitamin E and thromboxane synthesis in type I diabetes mellitus. *Diabetes*, 1984, 33(3): 239-243
- 413 Pritchard KA Jr, Patel ST, et al. Triglyceride-lowering effect of dietary vitamin E in streptozocin-induced diabetic rats. Increased lipoprotein lipase activity in livers of diabetic rats fed high dietary vitamin E. *Diabetes*, 1986, 35(3): 278-281
- 414 Behrens WA, Scott FW, et al. Increased plasma and tissue levels of vitamin E in the spontaneously diabetic BB rat. *Life Sci*, 1984, 35(2): 199-206
- 415 Asayama K, Nakane T, et al. Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res*, 1994, 26(7): 313-315
- 416 Sun F, Iwaguchi K, et al. Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*, 1999, 96(2): 185-190
- 417 Martinoli L, Di Felice M, et al. Plasma retinol and alpha-tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus: their relationship to microvascular complications. *Int J Vitam Nutr Res*, 1993, 63(2): 87-92
- 418 Granado F, Olmedilla B, et al. Carotenoids, retinol and tocopherols in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and their immediate relatives. *Clin Sci (Colch)*, 1998, 94(2): 189-

195

- 419 Caye-Vaugien C, Krempf M, et al. Determination of alpha-tocopherol in plasma, platelets and erythrocytes of type I and type II diabetic patients by high-performance liquid chromatography. *Int J Vitam Nutr Res*, 1990, 60(4): 324-30
- 420 Maxwell SR, Thomason H, et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27(6): 484-490
- 421 Jain SK, Levine SN, et al. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes*, 1991, 40(10): 1241-1244
- 422 Tamai H, Kim HS, et al. Plasma alpha-tocopherol level in diabetes mellitus. *Biofactors*, 2000, 11(1-2): 7-9
- 423 Vatassery GT, Krezowski AM y Eckfeldt JH. Vitamin E concentrations in human blood plasma and platelets. *Am J Clin Nutr*, 1983, 37(6): 1020-1024
- 424 Vatassery GT, Morley JE y Kuskowski MA. Vitamin E in plasma and platelets of human diabetic patients and control subjects. *Am J Clin Nutr*, 1983, 37(4): 641-644
- 425 Young IS, Tate S, et al. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(5): 833-840
- 426 Young IS, Torney JJ y Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Biol Med*, 1992, 13(1): 41-46
- 427 Mooradian AD y Morley JE. Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 1987, 45(5): 877-895
- 428 Burton GW, Webb A y Ingold KU. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*, 1985, 20: 29-39
- 429 Riss G, Kormann AW, et al. Separation of the eight stereoisomers of all-rac-alpha-tocopherol from tissues and plasma: chiral phase high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 302-310
- 430 Liebler DC, Burr JA, et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Anal. Biochem.*, 1996, 236(1): 27-34
- 431 Huo JZ, Nelis HJ, et al. Determination of vitamin E in aquatic organisms by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Biochem*, 1996, 242(1): 123-128
- 432 Podda M, Weber C, et al. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinolins, and ubiquinones. *J Lipid Res*, 1996, 37(4): 893-901
- 433 Leray C, Andriamampandry MD, et al. Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of alpha-tocopherol oxidation. *J Lipid Res*, 1998, 39(10): 2099-2105
- 434 Barua AB y Olson JA. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J Chromatogr B*, 1998, 707(1+2): 69-79
- 435 Thiele JJ y Packer L. Noninvasive measurement of alpha-tocopherol gradients in human stratum corneum by high-performance liquid chromatography analysis of sequential tape strippings. *Methods Enzymol*, 1999, 300: 413-419
- 436 Ueda F, Watanabe M, et al. Microwave irradiation is effective in the rapid fixation of gastric mucosa for determination of the prostaglandin content. *J Pharmacol Methods*, 1990, 24: 277-284

- 437 De Leenheer AP, De Bevere VO, et al. Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1979, 162(3): 408-413
- 438 Konings EJ, Roomans HH y Beljaars PR. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in margarine, infant foods, and vegetables. *J AOAC Int*, 1996, 79(4): 902-906
- 439 Albala-Hurtado S, Novella-Rodriguez S, et al. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1997, 778(1-2): 243-246
- 440 Pfalzgraf A, Steinhart H y Frigg M. Rapid determination of alpha-tocopherol in muscle and adipose tissues of pork. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1995, 200(3): 190-193
- 441 Ueda T, Ichikawa H y Igarashi O. Determination of alpha-tocopherol stereoisomers in biological specimens using chiral phase high-performance liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo*, 1993, 39(3): 207-219
- 442 Kanazawa H, Miyata C, et al. Determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherylquinone in rat tissues and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2000, 48(10): 1462-1466
- 443 Vatassery GT, Smith WE y Quach HT. A liquid chromatographic method for the simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherolquinone in human red blood cells and other biological samples where tocopherol is easily oxidized during sample treatment. *Anal Biochem*, 1993, 214: 426-430
- 444 Van Vliet T, Van Schaik F, et al. Determination of several retinoids, carotenoids and E vitamers by high-performance liquid chromatography. Application to plasma and tissues of rats fed a diet rich in either beta-carotene or canthaxanthin. *J Chromatogr*, 1991, 553(1-2): 179-186
- 445 Teissier E, Walters Laporte E, et al. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density lipoproteins. *Clin Chem*, 1996, 42(3): 430-435
- 446 Gobel Y, Schaffer C y Koletzko B. Simultaneous determination of low plasma concentrations of retinol and tocopherols in preterm infants by a high-performance liquid chromatographic micro-method. *J Chromatogr B*, 1997, 688(1): 57-62
- 447 Podda M, Weber C, et al. Sensitive high-performance liquid chromatography techniques for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones in biological samples. *Methods Enzymol*, 1999, 299: 330-341
- 448 Erhardt JG, Heinrich F y Biesalski HK. Determination of retinol, antioxidant vitamins and homocysteine in skin puncture blood. *Int J Vitam Nutr Res*, 1999, 69(5): 309-314
- 449 Gonzalez-Corbella MJ, Lloberas-Blanch N, et al. Determination of alpha-tocopherol in plasma and erythrocytes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 1994, 660(2): 395-400
- 450 Leray C, Andriamampandry M, et al. Quantitative analysis of vitamin E, cholesterol and phospholipid fatty acids in a single aliquot of human platelets and cultured endothelial cells. *J Chromatogr B*, 1997, 696(1): 33-42
- 451 Su Q, Rowley KG y O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *J Chromatogr B*, 1999, 729(1-2): 191-198
- 452 Gómez-Coronado D.J.M. y Barbas C. Optimised and validated HPLC method for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol measurement in *Laurus nobilis* leaves. New data on tocopherol content. *J Agric Food Chem*, (2003) in press.
- 453 Folch J, Lees M y Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total

- lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957, 226: 497-509
- 454 Zaspel BJ y Csallany AS. Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1983, 130: 146-150
- 455 Sarzanini C, Mentasti E, et al. Determination of plasma tocopherols by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *J Chromatogr*, 1993, 620(2): 268-272
- 456 Edlund PO. Determination of coenzyme Q10, alpha-tocopherol and cholesterol in biological samples by coupled-column liquid chromatography with coulometric and ultraviolet detection. *J Chromatogr*, 1988, 425(1): 87-97
- 457 Patel HR, Ashmore SP, et al. Improved high-performance liquid chromatographic technique for the determination of hepatic alpha-tocopherol. *J Chromatogr*, 1989, 495: 269-274
- 458 Mostow ND, O'Neill R, et al. Determination of alpha-tocopherol in rat liver by high-performance liquid chromatography utilizing ultraviolet detection. *J Chromatogr*, 1985, 344: 137-143
- 459 Torre J, Lorenzo M P, et al. Simple high-performance liquid chromatography method for alpha-tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves. New data on alpha-tocopherol content. *J Chromatogr A*, 2001, 919(2): 305-311.
- 460 Lechner M, Reiter B y Lorbeer E. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A*, 1999, 857(1-2): 231-238
- 461 Kramer JK, Blais L, et al. A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by high-performance liquid chromatography using a normal-phase diol column. *Lipids*, 1997, 32(3): 323-330
- 462 Abidi SL y Mounts TL. Normal phase high-performance liquid chromatography of tocopherols on polar phases. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 1996, 19(4): 509-520
- 463 Li SX, Cherian G, et al. Storage, heating and tocopherols affect cholesterol oxide formation in food oils. *J Agric Food Chem.*, 1996, 44: 3830-3834
- 464 Yarita T, Nomura A, et al. Supercritical fluid chromatographic determination of tocopherols on an ODS-silica gel column. *J Chromatogr A*, 1994, 679: 329-334
- 465 Bortolotti A, Lucchini G, et al. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and retinyl palmitate in plasma of premature newborns by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1993, 617(2): 313-317
- 466 Julianto T, Yuen KH y Noor AM. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of alpha-tocopherol in human plasma. *J Chromatogr B*, 1999, 732(1): 227-231
- 467 Ibáñez E, Palacios J, et al. Isolation and Separation of Tocopherols from Olive By-products with Supercritical Fluids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 2000, 77(2): 187-190
- 468 Zhao J, Yang G, et al. Determination of synthesized  $\alpha$ -vitamin E by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 2001, 22: 151-154
- 469 Chase GWJ, Eitenmiller RR y Long AR. A liquid chromatographic method for analysis of all-rac-alpha-tocopheryl acetate and retinyl palmitate in medical food using matrix solid-phase dispersion in conjunction with a zero reference material as a method development tool. *J AOAC Int*, 1999, 82(1): 107-111
- 470 Psomiadou E y Tsimidou M. Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 5132-5138

- 471 Ye L, Landen JL Jr y Eintemiller RR. Vitamin E content of margarine and reduced fat products using a simplified extraction procedure and HPLC determination. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 1998, 21(8): 1227-1238
- 472 Indyk HE. Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 1988, 113(8): 1217-1221
- 473 Indyk HE. Simultaneous liquid chromatographic determination of cholesterol, phytosterols and tocopherols in foods. *Analyst*, 1990, 115(12): 1525-1530
- 474 Lagouri V y Boskou D. Nutrient antioxidants in oregano. *Int J Food Sci Nutr*, 1996, 47: 493-497
- 475 Xue T, Piironen V y Hartikainen H. A small-scale HPLC method for determination of  $\alpha$ -tocopherol in fresh plant tissue. *Agrobiol Res*, 1997, 50 (3): 265-270
- 476 Emmons CL, Peterson DM y Paul GL. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(12): 4894-4898
- 477 Qureshi AA, Mo H, et al. Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3130-3140
- 478 Rettenmaier R y Schuep W. Determination of vitamins A and E in liver tissue. *Int J Vitam Nutr Res*, 1992, 62(4): 312-317
- 479 Schüep W y Rettenmaier R. Analysis of vitamin E analogs in plasma and tissue: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 294-316
- 480 Leray C, Andriamampandry MD, et al. Simultaneous determination of homologues of vitamin-E and coenzyme Q and products of  $\alpha$ -tocopherol oxidation. *J Lipid Res*, 1998, 39: 2099-2105
- 481 Qian H y Sheng M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J Chromatogr A*, 1998, 825(2): 127-133
- 482 Bonvehi JS, Coll FV y Rius IA. Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations, and biscuits. *J AOAC Int*, 2000, 83(3): 627-634
- 483 Scalia S, Ruberto G y Bonina F. Determination of vitamin A, vitamin E, and their esters in tablet preparations using supercritical fluid extraction and HPLC. *J Pharm Sci*, 1995, 84(4): 433-436
- 484 Turner C y Mathiasson L. Determination of vitamins A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up. *J Chromatogr A*, 2000, 874(2): 275-283
- 485 Vigo J, Lucero MJ y Leon MJ. Determination of alpha-tocopherol in semisolid gelled preparations by reversed phase HPLC. *Boll Chim Farm*, 1992, 131(11): 415-418
- 486 Richheimer S.L., Kent M.C. y Bernart M.W. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols. *J Chromatogr A*, 1994, 677(1): 75-80
- 487 Gimeno E, Calero E, et al. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and beta-carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2000, 881(1-2): 255-259.
- 488 Rader JI, Weaver CM, et al.  $\alpha$ -Tocopherol, total vitamin A and total fat in margarines and margarine-like products. *Food Chem.*, 1997, 58(4): 373-379



- 489 Gamiz-Gracia L, Velasco-Arjona A y Luque de Castro MD. Fully automated determination of vitamins A and E in milk-based products using a robotic station-HPLC arrangement. *Analyst*, 1999, 124(5): 801-804
- 490 Manzi P, Panfili G y Pizzoferrato L. Normal and Reversed-Phase HPLC for More Complete Evaluation of Tocopherols, Retinols, Carotenes and Sterols in Dairy Products. *Chromatographia*, 1996, 43(1/2): 89-93
- 491 Huo JZ, Nelis HJ, et al. Simultaneous determination of alpha-tocopheryl acetate and tocopherols in aquatic organisms and fish feed. *J Chromatogr B*, 1999, 724(2): 249-255
- 492 Murcia MA, Vera A y García-Carmona F. Determination by HPLC of changes in Tocopherol levels in spinach after industrial processing. *J Sci Food Agric*, 1992, 60(1): 81-84
- 493 DeLong JM y Steffen KL. Photosynthetic function, lipid peroxidation, and alpha-tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Can J Plant Sci*, 1997, 77(3): 453-459
- 494 Motchnik PA, Frei B y Ames BN. Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 269-279
- 495 Takeda H, Shibuya T, et al. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherolquinone by high-performance liquid chromatography and coulometric detection in the redox mode. *J Chromatogr A*, 1996, 722(1-2): 287-294
- 496 Constantinescu A, Pick U, et al. Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(2): 253-261
- 497 Lane JR, Webb LW y Acuff RV. Concurrent liquid chromatographic separation and photodiode array detection of retinol, tocopherols, all-trans-alpha-carotene, all-trans-beta-carotene and the mono-cis isomers of beta-carotene in extracts of human plasma. *J Chromatogr A*, 1997, 787(1-2): 111-118
- 498 Steghens JP, van Kappel AL, et al. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 1997, 694(1): 71-81
- 499 Wakabayashi H, Yamato S, et al. Simultaneous determination of oxidized and reduced coenzyme Q and alpha-tocopherol in biological samples by high performance liquid chromatography with platinum catalyst reduction and electrochemical detection. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(8): 997-1002
- 500 Finckh B, Kontush A, et al. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal Biochem*, 1995, 232(2): 210-216
- 501 Finckh B, Kontush A, et al. High-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical detection of ubiquinol 10, ubiquinone 10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma. *Methods Enzymol*, 1999, 299: 341-348
- 502 Stephens NG, Parsons A, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 1996, 347(9004): 781-786
- 503 Tangney CC, Shekelle RB, et al. Intra- and interindividual variation in measurements of beta-carotene, retinol, and tocopherols in diet and plasma. *Am J Clin Nutr*, 1987, 45(4): 764-769
- 504 Schaefer EJ, Woo R, et al. Mobilization of triglyceride but not cholesterol or tocopherol from human adipocytes during weight reduction. *Am J Clin Nutr*, 1983, 37: 749-754
- 505 Kayden HJ. Tocopherol content of adipose tissue from vitamin E-deficient humans. *Ciba Found Symp*, 1983, 101: 70-91

- 506 Hatam L y Kayden HJ. Tocopherol levels in needle aspiration biopsies of adipose tissue: normal subjects and abetalipoproteinemic patients. *Ann N Y Acad Sci*, 1982, 393: 222-223
- 507 Erickson MC. *J. Food. Sci. J. Food. Sci.*, 1991, 56: 1113-1114
- 508 Helrich K *Official methods of analysis*, Association of Analytical Chemists, Arlington, 1990.
- 509 Lang JK, Gohil K y Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal Biochem*, 1986, 157(1): 106-116
- 510 Udea T y Igarashi O. Effect of coexisting fat on the extraction of tocopherols from tissues after saponification as a pretreatment for HPLC determination. *J Micronutr Anal*, 1987, 3: 15-25
- 511 Bieri JG y Evarts RP. Tocopherols and polyunsaturated fatty acids in human tissues. *Am J Clin Nutr*, 1975, 28(7): 717-720
- 512 Schafer L, Overvad K, et al. Adipose tissue levels of fatty acids and tocopherol in young and old women. *Ann Nutr Metab* 1989, 33 (6): 315-322
- 513 Schafer L y Overvad K. Subcutaneous adipose-tissue fatty acids and vitamin E in humans: relation to diet and sampling site. *Am J Clin Nutr*, 1990, 52(3 ): 486-490
- 514 Parker RS. Carotenoid and tocopherol composition of human adipose tissue. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47: 33-36
- 515 Lopez Sabater MC, Agramont Llinas A, et al. Determinación de vitamina E en aceites vegetales. *Alimentaria*, 1986, 173: 37-52
- 516 Gutfinger T y Letan A. *Riv. It. Sost. Grasse. Riv. It. Sost. Grasse*, 1975, 52(6): 191-194
- 517 Frankel EN. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.*, 1996, 57: 51-55
- 518 Dionisi F, Prodoliet J y Tagliaferri E. Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography/ampereometric detection of tocopherols and tocotrienols. *J Am Oil Chem Soc*, 1995, 72(12): 1505-1511
- 519 Mordret F y Laurent AM. *Rev. Franç. Corps. Gras.*, 1978, 25(5): 245-250
- 520 Métodos oficiales de análisis de los aceites y grasas comestibles, *Métodos oficiales de análisis de los alimentos*, AMV y Mundi-Prensa, Madrid, 1994
- 521 Warner K y Mounts TL. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *J Am Oil Chem Soc*, 1990, 67: 827-831
- 522 Lang JK y Packer L. Quantitative determination of vitamin E and oxidized and reduced coenzyme Q by high-performance liquid chromatography with in-line ultraviolet and electrochemical detection. *J Chromatogr*, 1987, 385: 109-117
- 523 Thompson JN y Hatina G. Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues by high-performance liquid chromatography. *J Liquid Chromatogr*, 1979, 2: 327-344
- 524 Rammell CG, Pearson AB y Bentley GR. Vitamin E, selenium and polyunsaturated fatty acids in clinical normal grower (9-16 week old) pigs and their feed: relationship to the vitamin E/selenium deficiency ("VESD") syndrome. *N. Z. Vet. J.*, 1988, 36: 136-137
- 525 Piironen V, Varo P, et al. High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols and its application to diets and plasma of Finnish men. I. Analytical method. *Int J Vitam Nutr Res*, 1984, 54(1): 35-40

- 526 McMurray CH y Blanchflower WJ. Determination of alpha-tocopherol in animal feedstuffs using high-performance liquid chromatography with spectrofluorescence detection. *J Chromatogr*, 1979, 176(3): 488-492
- 527 Cort WMs, Vicente TS, et al. Vitamin E content of feedstuffs determined by high-performance liquid chromatographic fluorescence. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(6): 1330-1333
- 528 Pocklington WD y Diefenbacher A. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high-performance liquid chromatography. Results of a collaborative study and the standardised method. *Pure & Appl Chem*, 1988, 60: 877-892
- 529 Hogarty CJ, Ang C y Eitenmiller RR. Tocopherol content of selected foods by HPLC/fluorescence quantitation. *J Food Compos Anal*, 1989, 2(3): 200-209
- 530 Syväoja EL, Piironen V, et al. Tocopherols and tocotrienols in Finnish foods: human milk and infant formulas. *Int J Vitam Nutr Res*, 1985, 55(2): 159-166
- 531 Chung YK, Mahan DC y Lepine AJ. Efficacy of dietary D-alpha-tocopherol and DL-alpha-tocopheryl acetate for weanling pigs. *J Anim Sci*, 1992, 70(8): 2485-2492
- 532 Taylor P y Barnes P. Analysis for vitamin E in edible oils by high-performance liquid chromatography. *Chem. and Ind.* 1981, 1981: 722-726
- 533 Müller-Mulot W, Rohrer G, et al. Zur Auffindung von  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Dehydrotocopherol in Weizenkeimöl mittels HPLC und GC/MS - ein Beitrag zur Analytik der Tocopherole. *Fette Seifen Anstrichm*, 1983, 85: 66-72
- 534 Rammell CG y Hoogenboom JLL. Separation of tocopherols by HPLC on an amino-cyano polar phase column. *J. Liquid. Chromatogr.*, 1985, 8: 707-717
- 535 Chase GWJr, Akoh CC y Eitenmiller RR. Analysis of tocopherols in vegetable oils by high-performance liquid chromatography: comparison of fluorescence and evaporative light-scattering detection. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1994, 71: 877-880
- 536 Shindo Y, Witt E, et al. Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1994, 10(5): 183-191
- 537 Budin JT, Breene WM y Putnam DH. Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) seeds and oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1995, 72: 309-315
- 538 Meydani SN, Shapiro AC, et al. Effect of age and dietary fat (fish, corn and coconut oils) on tocopherol status of C57BL/6Nia mice. *Lipids*, 1987, 22(5): 345-350
- 539 Berlin E, McClure D, et al. Heart and liver fatty acid composition and vitamin E content in miniature swine fed diets containing corn and menhaden oils. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 109A: 53-61
- 540 Pascoe GA, Duda CT y Reed DJ. Determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherylquinone in small biological samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, 1987, 414(2): 440-448
- 541 Huang ML, Burckart GJ y Venkataramanan R. Sensitive high-performance liquid chromatographic analysis of plasma vitamin E and vitamin A using amperometric and ultraviolet detection. *J Chromatogr*, 1986, 380(2): 331-338
- 542 Vatassery GT y Smith WE. Determination of alpha-tocopherolquinone (vitamin E quinone) in human serum, platelets, and red cell membrane samples. *Anal Biochem*, 1987, 167(2): 411-417
- 543 AEFI. *Validación de métodos analíticos*, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria,

- 2001.
- 544 ICH. Validation of analytical methods: definition and terminology, ICH topic Q2A, *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 1996,
- 545 CDER. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. DRAFT GUIDANCE. <http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dff.htm>,
- 546 Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24(5-6): 755-767
- 547 ICH, en. Validation of analytical methods: Methodology, ICH Topic Q2B, *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 1995, p. 1-9.
- 548 Green JM. A practical guide to method validation. *Analytical Chemistry News and Features*, 1996,
- 549 Vander Heyden Y, Nijhuis A, et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24: 723-753
- 550 Lopez-Tejero D, Ferrer I, et al. Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth, sensory reflex maturation and brain development in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1986, 12(3): 251-260
- 551 Sampson DA y Jansen GR. Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1984, 3(4): 613-617
- 552 Lake N. Taurine depletion of lactating rats: effects of developing pups. *Neurochem Res*, 1983, 8(7): 881-887
- 553 Munilla MA y Herrera E. A cholesterol-rich diet causes a greater hypercholesterolemic response in pregnant than in nonpregnant rats and does not modify fetal lipoprotein profile. *J Nutr*, 1997, 127(11): 2239-2245
- 554 Cuesta Sanz D y Castro Santa-Cruz M. Simultaneous measurement of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr*, 1986, 380: 140-144
- 555 Barbas C, Castro M, et al. Simultaneous determination of vitamin A and E in rat tissues by HPLC. *J Chromatogr*, 1997, 778: 415-420
- 556 Ruperez FJ, Barbas C, et al. Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1998, 823(1-2): 483-487
- 557 Ruperez FJ, Barbas C, et al. Determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate in diets of experimental animals. Study of stability in the diets. *J Chromatogr A*, 1999, 839(1-2): 93-99
- 558 Buccolo L y David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*, 1973, 19: 476-482
- 559 Allain CC, Poon LS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 1974, 20(4): 470-475
- 560 Hugget ASG y Nixon DA. Use of glucose oxidase, peroxidase and O-diamisidine of blood and urinary glucose. *Lancet*, 1957, 1: 368-370
- 561 Jaffé M. Ueber del Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine

- neue Reaction del Kreatinins. *Z Physiol Chem*, 1886, 10: 391-400
- 562 Amusquivar E. Repercusión de la composición de ácidos grasos de la dieta durante la gestación y la lactancia sobre el desarrollo perinatal en la rata (Tesis Doctoral). Universidad San Pablo CEU. Madrid, 2001.
- 563 Finney DJ *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1952.
- 564 Jain SK, Wise R y Bocchini JJJ. Vitamin E and vitamin E-quinone levels in red blood cells and plasma of newborn infants and their mothers. *J Am Coll Nutr*, 1996, 15(1): 44-48
- 565 Jain SK y Levine SN. Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinone levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(2): 337-341
- 566 Jain, Sushil K. Oxidative stress, vitamin E and diabetes. *Antioxid Hum Health Dis*, 1999, 2: 249-257.
- 567 Vatassery GT. Oxidation of vitamin E in red cell membranes by fatty acids, hydroperoxides and selected oxidants. *Lipids*, 1989, 24(4): 299-304
- 568 Vatassery GT. Determination of tocopherols and tocopherolquinone in human red blood cell and platelet samples. *Methods Enzymol*, 1994, 234: 327-331
- 569 Guo F y Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav*, 1995, 57(4): 681-686
- 570 Argiles J y Herrera E. Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat. *Biol Neonate*, 1981, 39(1-2): 37-44
- 571 Alemany M y Herrera E. Lactate dehydrogenase and pyruvate kinase levels in the liver of fed and 24-hour fasted suckling rats. *Horm Metab Res*, 1975, 7(6): 523-524
- 572 Herrera E, Gomez-Coronado D y Lasuncion MA. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol Neonate*, 1987, 51(2): 70-77
- 573 Hamosh M, Cleary TR y Chernick SS. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and alactating rat. *Biochim Biophys Res Acta*, 1970, 210: 473-482
- 574 Lasunción MÁ y Herrera E. Effect of pregnancy on the uptake of lipoprotein triglyceride fatty acids by isolated adipocytes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 98: 227-233
- 575 Otway S y Robinson DS. Significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipemia of pregnancy. *Biochem J*, 1968, 206: 796-804
- 576 Traber MG, Ramakrishnan R y Kayden HJ. Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(21): 10005-10008
- 577 Kaempf-Rotzoll DE, Igarashi K, et al. alpha-Tocopherol transfer protein is specifically localized at the implantation site of pregnant mouse uterus. *Biol Reprod*, 2002, 67 (2): 599-604
- 578 Viana M, Barbas C, et al. Alpha-tocopherol concentration in fetal and maternal tissues of pregnant rats supplemented with alpha-tocopherol. *Ann Nutr Metab*, 1999, 43(2): 107-112
- 579 Traber MG. Vitamin E bioavailability, biokinetics, and metabolism. *Oxidative Stress and Disease*, 2002, 8(Handbook of Antioxidants): 99-108
- 580 Aalto Setala K, Bisgaier CL, et al. Intestinal expression of human apolipoprotein A-IV in transgen-

- ic mice fails to influence dietary lipid absorption or feeding behavior. *J Clin Invest*, 1994, 93(4): 1776-1786
- 581 Azzi A, Boscoboinik D, et al. Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62(6 Suppl): 1337S-1346S
- 582 Kempna P, Zingg JM, et al. Cloning of novel human SEC14p-like proteins: ligand binding and functional properties. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(11): 1458-1472
- 583 Brigelius-Flohe Regina, Kelly Frank J, et al. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*, 2003, 76(4): 703-716.
- 584 Christiansen EN, Piyasena C, et al. Vitamin E deficiency in phrynoderma cases from Sri Lanka. *Am J Clin Nutr*, 1988, 47(2): 253-255
- 585 Choi MA, Kim BS y Yu R. Serum antioxidative vitamin levels and lipid peroxidation in gastric carcinoma patients. *Cancer Lett*, 1999, 136(1): 89-93
- 586 Raza H, Ahmed I, et al. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. *J Biochem Mol Toxicol*, 2000, 14(3): 131-139
- 587 Smart JL y Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*, 1971, 28(1): 85-95
- 588 Yokota T, Shiojiri T, et al. Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *Ann Neurol*, 1997, 41(6): 826-832
- 589 Aguié GA, Rader DJ, et al. Lipoproteins containing apolipoprotein B isolated from patients with abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: identification and characterization. *Atherosclerosis*, 1995, 118(2): 183-191
- 590 Saste MD, Carver JD, et al. Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. *J Nutr*, 1998, 128(4): 740-743
- 591 Huang YS, Wainwright PE, et al. Effect of maternal dietary fats with variable n-3/n-6 ratios on tissue fatty acid composition in suckling mice. *Lipids*, 1992, 27(2): 104-110
- 592 Nakashima Y, Yuasa S, et al. Effect of a high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice. *J Lipid Res*, 1993, 34(2): 239-247
- 593 Bourre JM. Nature, origin and role of fatty acids of the nervous system: an essential fatty acid, an alpha-linolenic acid, changing the structure and the cerebral function. *Bull Acad Natl Med*, 1989, 173(9): 1137-1148
- 594 Simpson JL, Ljungqvist A, et al. Gender verification in competitive sports. *Sports Med*, 1993, 16(5): 305-315
- 595 Ollivier-Bousquet M, Guesnet P, et al. Deficiency of (n-6) but not (n-3) polyunsaturated fatty acids inhibits the secretagogue effect of prolactin in lactating rat mammary epithelial cells. *J Nutr*, 1993, 123(12): 2090-2100
- 596 Gavino VC y Gavino GR. Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides. *Lipids*, 1992, 27(12): 950-954
- 597 Tavares do Carmo MG, Oller do Nascimento CM, et al. Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. *Alcohol*, 1999, 18(1): 71-76
- 598 Weiss WP, Fisher GR y Erickson GM. Effect of source of neutral detergent fiber and starch on

- nutrient utilization by dairy cows. *J Dairy Sci*, 1989, 72(9): 2308-2315
- 599 Njeru CA, McDowell LR, et al. Serum and tissue tocopherol in sheep after intramuscular injection and(or) dietary vitamin E supplementation. *J Anim Sci*, 1994, 72(3): 739-745
- 600 Njeru CA, McDowell LR, et al. Pre- and postpartum supplemental DL-alpha-tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *J Anim Sci*, 1994, 72(6): 1636-1640
- 601 Amusquivar E, Ruperez FJ, et al. Low arachidonic acid rather than alpha-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J Nutr*, 2000, 130(11): 2855-2865
- 602 Cho SH y Choi YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids*, 1994, 29(1): 47-52
- 603 Maziere C, Dantin F, et al. Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem J*, 1998, 336 ( Pt 1): 57-62
- 604 Öztecan S., Toker G y Uysal M. The susceptibility of plasma to lipid peroxidation in rats fed on diets supplemented with olive oil and sunflower seed oil. *Biochem Arch*, 1996, 12: 13-18
- 605 Uhley VE, Pellizzon MA, et al. Chronic weight cycling increases oxidative DNA damage levels in mammary gland of female rats fed a high-fat diet. *Nutr Cancer*, 1997, 29(1): 55-59
- 606 Zaidenberg A, Tournier H, et al. Effects of trifluralin on *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol*, 1999, 84(2): 98-100
- 607 Dobbing J y Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 1979, 3(1): 79-83
- 608 Pomeroy BD, Keim LW y Taylor RJ. Preoperative hyperbaric oxygen therapy for radiation induced injuries. *J Urol*, 1998, 159(5): 1630-1632
- 609 Pappert EJ, Tangney CC, et al. Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: dose-response study and correlations with plasma levels. *Neurology*, 1996, 47(4): 1037-1042
- 610 Martin A, Janigian D, et al. Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Res*, 1999, 845(1): 50-59
- 611 Vatassery GT, Brin MF, et al. Effect of high doses of dietary vitamin E on the concentrations of vitamin E in several brain regions, plasma, liver, and adipose tissue of rats. *J Neurochem*, 1988, 51(2): 621-623
- 612 Vatassery GT. Vitamin E. Neurochemistry and implications for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, 669: 97-100
- 613 Adams JD Jr y Wang B. Vitamin E uptake into the brain and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine toxicity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14(2): 362-363
- 614 Adachi K, Izumi M y Mitsuma T. Effect of vitamin E deficiency on rat brain monoamine metabolism. *Neurochem Res*, 1999, 24(10): 1307-1311
- 615 Cotter MA y Cameron NE. Effects of dietary supplementation with arachidonic acid rich oils on nerve conduction and blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1997, 56(5): 337-343
- 616 Dines KC, Cotter MA y Cameron NE. Contrasting effects of treatment with omega-3 and omega-6

- essential fatty acids on peripheral nerve function and capillarization in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 1993, 36(11): 1132-1138
- 617 Feillet-Coudray C, Rock E, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta*, 1999, 284(1): 31-43
- 618 Herrmann RK, Robison WG Jr y Bieri JG. Deficiencies of vitamins E and A in the rat: lipofuscin accumulation in the choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1984, 25(4): 429-33
- 619 Rabbani PI, Alam HZ, et al. Subchronic toxicity of fish oil concentrates in male and female rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2001, 47(3): 201-212
- 620 Packer L, Kraemer K y Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17(10): 888-895.
- 621 Eck MG, Wynn JO, et al. Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*, 1979, 28(5): 479-485
- 622 Wilson MD, Hays RD y Clarke SD. Inhibition of liver lipogenesis by dietary polyunsaturated fat in severely diabetic rats. *J Nutr*, 1986, 116(8): 1511-1518
- 623 Baydas G, Canatan H y Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res*, 2002, 32(4): 225-230
- 624 van Dam PS, van Asbeck BS, et al. Glutathione and alpha-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state. *Eur J Clin Invest*, 2001, 31(5): 417-424
- 625 Bachi A, Brambilla R, et al. Reduction of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha during cyclo-oxygenase inhibition in rats but not in man. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(8): 1770-4
- 626 Montero A, Munger KA, et al. F(2)-isoprostanes mediate high glucose-induced TGF-beta synthesis and glomerular proteinuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int*, 2000, 58(5): 1963-1972
- 627 Mori TA, Puddey IB, et al. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep*, 2000, 5(1): 45-46
- 628 Mori TA, Dunstan DW, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 1999, 48(11): 1402-1408
- 629 Montilla P, Muñoz MC, et al. Lipoperóxidos en la diabetes por estreptozocina en ratas. Efectos de la administración de insulina. *Clin Invest Arteriosclerosis*, 1992, 4, 149-152,
- 630 Muñoz MC, Tunez I, et al. Curso evolutivo de la glucosa, fructosamina y lipoperóxidos plasmáticos en ratas diabéticas por STZ. Efectos de la vitamina E. *Clin Invest Arteriosclerosis*, 1993, 5: 114-117
- 631 Santini SA, Marra G, et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, 1997, 46(11): 1853-1858
- 632 Dmoszynska A, Walter-Croneck A y Ledwozyw A. Lipid peroxidation products and changes in phospholipid composition induced by indobufen in diabetic platelets. *Thromb Res*, 1995, 79(5-6): 483-490
- 633 Jain SK, Palmer M y Chen Y. Effect of vitamin E and N-acetylcysteine on phosphatidylserine externalization and induction of coagulation by high-glucose-treated human erythrocytes. *Metabolism*, 1999, 48(8): 957-959
- 634 Jain SK, Palmer M y Chen Y. Effect of vitamin E and N-acetylcysteine on phosphatidylserine externalization and induction of coagulation by high-glucose-treated human erythrocytes. *Metab*



*Clin Exp*, 1999, 48(8): 957-959

- 635 Hatam LJ y Kayden HJ. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res*, 1979, 20(5): 639-645





# Protocolos Experimentales



## APÉNDICE I: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

### VALORACIÓN DE VITAMINA E EN PLASMA DE RATA

#### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Acetato de vitamina A: vitamin A-acetate, Fluka
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y NaOH P.A.
- $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura.
- Metanol, etanol y hexano calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector UV
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Evaporador centrífugo

#### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Acetato de vitamina A: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 20.0 mg de vitamin A-acetate y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de Acetato de vitamina A y se conserva a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se disuelven en unos 80 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### VALORACIÓN

##### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 125  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a 50 mL de etanol en matraz aforado. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- 100  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de acetato de vitamina A y se llevan a 10 mL de etanol en matraz aforado. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de acetato de vitamina A.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

##### Procesamiento de patrones y muestras

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Tampón fosfato	Plasma	$\alpha$ -tocoferol	A Acetato	Etanol	Metanol
Patrones	200 $\mu\text{L}$	-	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
Muestras	-	200 $\mu\text{L}$		50 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se agita en vórtex durante 1 min. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redissuelve en 200  $\mu\text{L}$  de metanol y se trasvasa a viales de cromatografía.

##### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol: $\text{H}_2\text{O}$  97.5:2.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu\text{m}$  (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40 $^\circ\text{C}$
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 40  $\mu\text{L}$
- Detección: UVD 294-298 nm.
- t total de análisis  $\approx$  6 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN HÍGADO DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH P.A.
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector UV y FD
- Espectrofotómetro, Sonicador, Centrífuga y Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a -20 °C.
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a -20 °C.
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disuelven en unos 80 mL de H<sub>2</sub>O. Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con H<sub>2</sub>O.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 25 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- La disolución de trabajo de vitamina K es la misma que la *stock*.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

Previamente se prepara el hígado en un homogeneizador de émbolo tipo Potter, mezclando un fragmento de tejido con 1  $\mu$ L de tampón fosfato por cada mg de hígado.

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Tampón fosfato	Homogeneizado	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
Patrones	50 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Muestras	-	50 $\mu$ L		50 $\mu$ L

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 200  $\mu$ L de metanol:cloroformo 3:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 97.5:2.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5 $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu$ L
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}$ =295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =350 nm hasta el minuto 6;  $\lambda_{\text{ex}}$ =330 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =400 nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  25 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN PLACENTA DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH P.A.
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro, Sonificador, Centrífuga, Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a -20 °C.
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a -20 °C.
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disuelven en unos 80 mL de H<sub>2</sub>O. Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con H<sub>2</sub>O.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 50  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- La disolución de trabajo de vitamina K es la misma que la *stock*.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

Previamente se prepara la muestra en un homogeneizador de émbolo tipo Potter, mezclando un fragmento de tejido con 8  $\mu$ L de tampón fosfato por cada mg de placenta.

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Tampón fosfato	Homogeneizado	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
Patrones	200 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Muestras	-	200 $\mu$ L		50 $\mu$ L

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 200  $\mu$ L de metanol:cloroformo 1:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 97.5:2.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu$ L
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}$ =295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =350 nm hasta el minuto 6;  $\lambda_{\text{ex}}$ =330 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =400 nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  10 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN CEREBRO DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH P.A.
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro, Sonicator, Centrífuga, Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a -20 °C.
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a -20 °C.
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disuelven en unos 80 mL de H<sub>2</sub>O. Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con H<sub>2</sub>O.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 50  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- La disolución de trabajo de vitamina K es la misma que la *stock*.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

Previamente se prepara la muestra en un homogeneizador de émbolo tipo Potter, mezclando un fragmento de tejido con 8  $\mu$ L de tampón fosfato por cada mg de cerebro.

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Tampón fosfato	Homogeneizado	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
<b>Patrones</b>	200 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>Muestras</b>	-	200 $\mu$ L		50 $\mu$ L

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 200  $\mu$ L de metanol:cloroformo 1:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 97.5:2.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu$ L
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}$ =295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =350 nm hasta el minuto 6;  $\lambda_{\text{ex}}$ =330 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =400 nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  10 min



## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro
- Sonicador
- Centrífuga
- Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a -20 °C.
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a -20 °C.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- 1000  $\mu$ L de la disolución *stock* de vitamina K y se llevan a matraz aforado de 5 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de vitamina K.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

Previamente se prepara el tejido adiposo en un homogeneizador de émbolo tipo Potter, mezclando un fragmento de tejido con 10  $\mu$ L de etanol:agua 1:1 (v/v) por cada mg de tejido adiposo.

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Etanol:agua	Homogeneizado	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
Patrones	200 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Muestras	-	200 $\mu$ L		50 $\mu$ L

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 400  $\mu$ L de metanol:cloroformo 1:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 96.5:3.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu$ L
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}$ =295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =350 nm hasta el minuto 9;  $\lambda_{\text{ex}}$ =330 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =400 nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  15 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN GLÁNDULA MAMARIA DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH P.A.
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro, Sonicator, Centrífuga, Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a -20 °C.
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a -20 °C.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- 1000  $\mu$ L de la disolución *stock* de vitamina K y se llevan a matraz aforado de 5 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de vitamina K.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

Previamente se prepara la muestra en un homogeneizador de émbolo tipo Potter, mezclando polvo de glándula mamaria (triturada en N<sub>2</sub> líquido en un mortero de porcelana) con 10  $\mu$ L de etanol:agua 1:1 (v/v) por cada mg de glándula mamaria.

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Etanol:agua	Homogeneizado	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
Patrones	200 $\mu$ L	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Muestras	-	200 $\mu$ L		50 $\mu$ L

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redissuelve en 750  $\mu$ L de metanol:cloroformo 1:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 96.5:3.5 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu$ L
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}$ =295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =350 nm hasta el minuto 9;  $\lambda_{\text{ex}}$ =330 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =400 nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  15 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN LECHE DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Fenildodecano: Phenildodecane, Merck
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y NaOH P.A.
- $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Fenildodecano: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de Phenildodecane y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de Fenildodecano y se conserva a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se disuelven en unos 80 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con  $\text{H}_2\text{O}$ .

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 125  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- 500  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de fenildodecano y se llevan a matraz aforado de 10 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de fenildodecano.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en el patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

En tubos de centrífuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Tampón fosfato	Leche	$\alpha$ -tocoferol	Fenildodecano	Etanol	Metanol
<b>Patrones</b>	200 $\mu\text{L}$	-	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
<b>Muestras</b>	150	50 $\mu\text{L}$	-	50 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$

Se agita en vórtex.

Para extraer el  $\alpha$ -tocoferol se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 300  $\mu\text{L}$  de metanol:cloroformo 2:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

- Fase móvil: Metanol: $\text{H}_2\text{O}$  94:6 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$  (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40 $^\circ\text{C}$
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 25  $\mu\text{L}$
- Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}=260 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=600 \text{ nm}$  hasta el minuto 8;  $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=350 \text{ nm}$  hasta el final
- t total de análisis  $\approx 12 \text{ min}$

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN DIETAS EXPERIMENTALES

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Acetato de vitamina E: Vitamin E acetate, Fluka
- Fenildodecano: Phenildodecane, Merck
- BHT: Butylated hydroxytoluene, Sigma
- EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid disodic salt, Sigma
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector UV y de fluorescencia
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Sonicador
- Evaporador centrífugo

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a  $-20$  °C.
- Acetato de vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de Vitamin E acetate y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de acetato de vitamina E y se conserva a  $-20$  °C.
- Fenildodecano: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de Phenildodecane y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de Fenildodecano y se conserva a  $-20$  °C.
- BHT 200 mM: En matraz aforado de 100 mL, se pesan exactamente alrededor de 3.32 g de Butylated hydroxytoluene y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de BHT y se conserva a 4 °C.
- EDTA 200 mM: En matraz aforado de 100 mL, se pesan exactamente alrededor de 7.445 g de Ethylene diaminetetraacetic acid disodic salt y se disuelve y enrasa con agua. Esta es la disolución *stock* de EDTA y se conserva a 4 °C.

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 125  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- 375  $\mu$ L de la disolución *stock* de acetato de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a matraz aforado de 50 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de acetato de  $\alpha$ -tocoferol.
- Se prepara una mezcla 1:1 de ambos patrones de trabajo
- 500  $\mu$ L de la disolución *stock* de fenildodecano y se llevan a matraz aforado de 10 mL. Se enrasa con etanol. Este es el patrón de trabajo de fenildodecano.
- 5 mL de la disolución *stock* de BHT y se llevan a matraz aforado de 25 mL. Se enrasa con etanol.
- 1.25 mL de la disolución *stock* de EDTA y se llevan a matraz aforado de 25 mL. Se enrasa con agua.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en su patrón de trabajo en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  y la concentración real de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en su patrón de trabajo se determina en el espectrofotómetro a 284 nm, según  $\epsilon = 2057 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

En tubos de centrifuga de fondo redondo de 100x10 mm se preparan:

	Dieta	Patrón E y E acetato	BHT	Fenildodecano	Etanol	Metanol	EDTA	Agua
Patrones	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Muestras	100 mg	-	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	-

Se agita en vórtex.

Para extraer la vitamina E se añade 1 mL de hexano y se sonica durante 10 s. Se centrifuga a 500 g durante 5 min a T ambiente y se separa el sobrenadante. Se repite la extracción y centrifugación y se juntan los dos sobrenadantes. La fase acuosa se descarta y la orgánica se evapora a sequedad mediante vacío en un evaporador centrífugo. El residuo seco se redisuelve en 200  $\mu$ L de metanol:cloroformo 1:1 (v/v) y se trasvasa a viales de cromatografía.

### **Cromatografía**

- Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 94:6 (v/v) desgasificada.
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu$ m (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 40  $\mu$ L
- Detección:
  - FD:  $\lambda_{\text{ex}}=260$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=600$  nm hasta el minuto 8;  $\lambda_{\text{ex}}=295$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=350$  nm hasta el final.
  - UVD:  $\lambda=260$  nm hasta el minuto 8,  $\lambda=295$  nm hasta el minuto 13 y  $\lambda=284$  nm hasta el final
- t total de análisis  $\approx$  18 min

## VALORACIÓN DE VITAMINA E EN ACEITE

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Vitamina K: vitamin K<sub>1</sub>, Sigma
- Metanol, etanol, cloroformo y hexano Calidad HPLC
- Cromatógrafo de líquidos con detector de fluorescencia
- Espectrofotómetro

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Vitamina K: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 14.0 mg de vitamin K<sub>1</sub> y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de vitamina K y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- 1.25 mL de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y se llevan a 25 mL de etanol en matraz aforado. Se enrasa con etanol. De esta dilución intermedia se toma 1 mL que se lleva a matraz aforado de 10 mL y se enrasa con cloroformo:metanol 1:1 (v/v). Este es el patrón de trabajo de  $\alpha$ -tocoferol.
- La disolución de trabajo de vitamina K es la misma que la *stock*.

La concentración real de  $\alpha$ -tocoferol se determina en la dilución intermedia en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### Procesamiento de patrones y muestras

En matraces aforados de 10 mL se preparan:

	Aceite	$\alpha$ -tocoferol	Vitamina K
<b>Patrones</b>	-	1 mL	0.5 mL
<b>Muestras</b>	100 mg		0.5 mL

- Se enrasan todos los matraces con cloroformo:metanol 1:1 (v/v) y se toma una alícuota que se trasvasa a viales de cromatografía.

#### Cromatografía

Fase móvil: Metanol:H<sub>2</sub>O 96.5:3.5 (v/v) desgasificada.

Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5  $\mu\text{m}$  (Teknokroma)

Temperatura: 35-40°C

Flujo: 2 mL/min

Inyección: 40  $\mu\text{L}$

Detección: FD  $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=350 \text{ nm}$  hasta el minuto 9;  $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=400 \text{ nm}$  hasta el final

- t total de análisis  $\approx 12 \text{ min}$

## SÍNTESIS DE $\alpha$ -TOCOFEROL QUINONA A PARTIR DE $\alpha$ -TOCOFEROL:

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- KCl, Agar, LiClO<sub>4</sub>, NaOOC-CH<sub>3</sub>, HOOC-CH<sub>3</sub> (Panreac)
- Metanol, Etanol Calidad HPLC
- Agua ultrapura.
- Potenciostato

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Disolución A: Pesar 12.033 g LiClO<sub>4</sub>, 2.051 g NaOOC-CH<sub>3</sub> y 1.501 g HOOC-CH<sub>3</sub>, disolver en aproximadamente 300 mL de agua y transferir cuantitativamente a matraz aforado de 500 mL. Enrasar con agua.
- Fase móvil: Metanol:Disolución A 92:8 (v/v).
- KCl 3M: Pesar 228.3 g y disolver en 1 L de agua.
- Tapón de Agar: Mezclar 0.25 g de agar, 1.5 g de KNO<sub>3</sub> con 10 mL de agua. Calentar hasta ebullición y depositar unas gotas de la disolución en el fondo de los puentes salinos. Enfriar en corriente de agua.
- Disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol: Pesar en matraz aforado de 25 mL exactamente alrededor de 1 g de  $\alpha$ -tocoferol. Disolver y enrasar con etanol.
- Disolución de síntesis: Tomar 0.5 mL de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol y transferir a un matraz aforado de 100 mL. Enrasar con la fase móvil.

### CULOMBIMETRÍA

- Celda electroquímica: Se transfiere la disolución de síntesis a una célula electroquímica del volumen apropiado.
  - Electrodo de trabajo: Malla de platino
  - Electrodo auxiliar o contraelectrodo: Lámina de platino, separada de la disolución dentro de un tubo con frita porosa con tapón de agar rellena de KCl 3M.
- Para oxidar el  $\alpha$ -tocoferol se aplica un potencial constante de +0.6V durante al menos 4 horas. La disolución resultante se almacena a -20 °C hasta el día del análisis.

## **SÍNTESIS DE $\alpha$ -TOCOFEROL HIDROQUINONA A PARTIR DE $\alpha$ -TOCOFEROL QUINONA:**

### **REACTIVOS Y EQUIPOS**

- Hg
- Agar, KNO<sub>3</sub>
- Agua
- Disolución de  $\alpha$ -tocoferol quinona
- Potenciostato

### **DISOLUCIONES PREVIAS**

- Tapón de Agar: Mezclar 0.25 g de agar, 1.5 g de KNO<sub>3</sub> con 10 mL de agua. Calentar hasta ebullición y depositar unas gotas de la disolución en el fondo del puente salino. Enfriar en corriente de agua.

### **CULOMBIMETRÍA**

- Celda culombimétrica: Se pesan aproximadamente 70 g de Hg en una célula especial que permite conectar el Hg con el electrodo. Se añaden 25 mL de la disolución de  $\alpha$ -tocoferol quinona y se burbujea con N<sub>2</sub> durante 15 min para desplazar el oxígeno disuelto. Se introduce el electrodo auxiliar de lámina de Pt directamente en la disolución y el electrodo de referencia se conecta a través de un puente salino con tapón de agar.
- Con agitación constante se aplica un potencial de  $-0.30$  V durante 2-3 horas, hasta que la pendiente de la culombimetría es constante. La disolución resultante se almacena a  $-20$  °C hasta el día del análisis.



## **CUANTIFICACIÓN ELECTROQUÍMICA DE $\alpha$ -TOCOFEROL HIDROQUINONA**

### **REACTIVOS Y EQUIPOS**

- Perclorato de tetraetilamonio
- Acetonitrilo Calidad HPLC
- Agar,  $\text{KNO}_3$
- Agua
- Disolución de  $\alpha$ -tocoferol quinona
- Potenciostato

### **DISOLUCIONES PREVIAS**

- Tapón de Agar: Mezclar 0.25 g de agar, 1.5 g de  $\text{KNO}_3$  con 10 mL de agua. Calentar hasta ebullición y depositar unas gotas de la disolución en el fondo del puente salino. Enfriar en corriente de agua.
- Medio de reacción: Se pesan 11.49 g de perclorato de tetraetilamonio y se disuelven en 1 L de acetonitrilo.

### **CULOMBIMETRÍA**

- En la célula de medida se preparan 100 mL del medio de reacción, en la que se sumerge la malla de Pt, el electrodo auxiliar de lámina de Pt en el puente relleno con el mismo medio (y tapón de agar en el extremo) y el electrodo de referencia en puente salino relleno con KCl 3M (y tapón de agar).
- Con agitación constante se aplica un potencial de +0.40 V y se espera a que la corriente alcance un valor constante. Entonces se añaden, con micropipeta, 100  $\mu\text{L}$  de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocoferol hidroquinona. Se debe producir un aumento brusco de la corriente y un descenso exponencial hasta hacerse constante. Mediante el área bajo la exponencial se cuantifica la cantidad de hidroquinona en la disolución

## VALORACIÓN DE $\alpha$ -TOCOFEROL, $\alpha$ -TOCOFEROL QUINONA Y $\alpha$ -TOCOFEROL HIDROQUINONA EN SANGRE DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Vitamina E: dl- $\alpha$ -tocopherol, Fluka
- Tocol
- Disolución de  $\alpha$ -tocopherol quinona
- Disolución de  $\alpha$ -tocopherol hidroquinona
- BHT: Butylated hydroxytoluene, Sigma
- EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid disodic salt, Sigma
- H<sub>2</sub>O ultrapura.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaOH P.A.
- Etanol, metanol y acetona Calidad HPLC
- LiClO<sub>4</sub>, NaOOC-CH<sub>3</sub>, HOOC-CH<sub>3</sub>
- Cromatógrafo de líquidos con detector electroquímico
- Espectrofotómetro, Sonicador, Potenciostato, Centrífuga

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Vitamina E: En matraz aforado de 25 mL, se pesan exactamente alrededor de 200.0 mg de dl- $\alpha$ -tocopherol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocopherol y se conserva a -20 °C.
- Tocol: En matraz aforado de 10 mL, se pesan exactamente alrededor de 30.0 mg de tocol y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocopherol y se conserva a -20 °C.
- BHT 200 mM: En matraz aforado de 100 mL, se pesan exactamente alrededor de 3.32 g de Butylated hydroxytoluene y se disuelve y enrasa con etanol. Esta es la disolución *stock* de BHT y se conserva a 4 °C.
- EDTA 0.2 g/mL: En vaso de precipitados, se pesan exactamente alrededor de 20 g de Ethylene diaminetetraacetic acid disodic salt y se disuelve con agua. Se transfiere cuantitativamente a matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua. Se conserva a 4 °C.
- Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4: Se pesan 68 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se disuelven en unos 80 mL de H<sub>2</sub>O. Se lleva la disolución hasta pH 7.4 con una disolución de NaOH 0.1 M y se transfiere cuantitativamente la disolución a un matraz aforado de 100 mL. Se enrasa con H<sub>2</sub>O.
- Disolución A: Pesar 12.033 g LiClO<sub>4</sub>, 2.051 g NaOOC-CH<sub>3</sub> y 1.501 g HOOC-CH<sub>3</sub>, disolver en aproximadamente 300 mL de agua y transferir cuantitativamente a matraz aforado de 500 mL. Enrasar con agua y filtrar a vacío con Kitasato

### VALORACIÓN

#### Patrones

En el día de la valoración se toman:

- BHT: se toman 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de BHT y se llevan a 25 mL con acetona en matraz aforado.
- Patrón TTQ: Se toman 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de BHT, 1000  $\mu$ L de la disolución de  $\alpha$ -tocopherol quinona y 75  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocopherol y se llevan a 25 mL con acetona en matraz aforado.
- Patrón THQ: se toman 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de BHT y 25  $\mu$ L de la disolución de  $\alpha$ -tocopherol hidroquinona y se llevan a 25 mL con acetona en matraz aforado.
- Patrón TL: se toman 100  $\mu$ L de la disolución *stock* de BHT y 50  $\mu$ L de la disolución *stock* de tocol y se llevan a 25 mL con acetona en matraz aforado.
- Patrón de valoración de  $\alpha$ -tocopherol: Se toman 75  $\mu$ L de la disolución *stock* de  $\alpha$ -tocopherol y se llevan a 25 mL con etanol en matraz aforado.
- Patrón de valoración de  $\alpha$ -tocopherol quinona: Se toman 1000  $\mu$ L de la disolución de  $\alpha$ -tocopherol quinona y se llevan a 25 mL con etanol en matraz aforado.
- Mezclar 2 partes de tampón fosfato por una parte de EDTA (v/v).

La concentración real de  $\alpha$ -tocopherol se determina en su patrón de valoración en el espectrofotómetro a 294 nm, según  $\epsilon = 3058 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La concentración real de  $\alpha$ -tocopherol hidroquinona se determina en la disolución *stock* electroquímicamente. La concentración real de  $\alpha$ -tocopherol quinona se determina en su patrón de valoración en el espectrofotómetro a 268 nm, según  $\epsilon = 19730 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### Procesamiento de patrones y muestras

- Mezclar 2 partes de sangre por una parte de EDTA (v/v).

En tubos eppendorf de 1.5 mL mm se preparan:

		BHT (Acetona)	Sangre (EDTA)	Patrón TTQ	Patrón THQ	Patrón TL	Fosfato/EDTA
<b>Patrones</b>	<b>TQT</b>	300 µL	-	50 µL	-	50 µL	200 µL
	<b>THQ</b>	-	-	-	50 µL	50 µL	200 µL
<b>Muestras</b>		350 µL	200 µL	-	-	50 µL	

Se sonicán todos los eppendorf y se centrifuga a 11480 g durante 1 min. El sobrenadante se trasvasa a viales de cromatografía para su posterior análisis.

### **Cromatografía**

- Fase móvil: Metanol:Disolución A 92:8 (v/v).
- Columna: Nucleosil C18 150x4.6 mm 5 µm (Teknokroma)
- Temperatura: 35-40°C
- Flujo: 2 mL/min
- Inyección: 40 µL
- Detección:
  - ED:  $\Delta V_1 = -350$  mV;  $\Delta V_2 = 700$  mV; Filtro: 0.2 Hz; Rango: 0.1 µA.

## VALORACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS EN PLASMA DE RATA

### REACTIVOS Y EQUIPOS

- Cloroformo y metanol Calidad HPLC previamente desgasificados durante al menos 30 min mediante corriente de nitrógeno. El cloroformo se almacena en hielo hasta el momento de su utilización y una parte se mezcla con metanol en la proporción cloroformo:metanol 2:1 (v/v).
- Disolución patrón de hidroperóxidos, Extract <sup>®</sup>, FTS1 <sup>®</sup> y FTS2 <sup>®</sup> (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, Estados Unidos)
- Espectrofotómetro
- Centrífuga

### DISOLUCIONES PREVIAS

- Todos los reactivos se tienen que preparar y usar en el día del análisis.
- Disolución de Extract R <sup>®</sup>: pesar aproximadamente 100 mg del Extract R sólido, disolver en aproximadamente 15 mL de metanol, agitar. La disolución no es completa, queda un resto de precipitado.

### VALORACIÓN

#### Preparación de muestras

Por triplicado, alicuotar 200  $\mu$ L de plasma en tubos de vidrio, añadir el mismo volumen de la disolución de Extract R y agitar. Añadir 600  $\mu$ L de Cloroformo y agitar intensamente. Centrifugar a aproximadamente 500 g durante 5 min (manteniendo la centrífuga a 0 °C). Con pipetas Pasteur, se recoge el infranadante, procurando que no se contamine en absoluto con el sobrenadante. Este es el extracto de muestra.

#### Procesamiento de patrones y muestras

En tubos de vidrio, preparar una serie de patrones de concentración creciente, siguiendo el siguiente esquema (cada uno de los niveles de patrón se debe ensayar por triplicado):

		Patrón de hidroperóxidos ( $\mu$ L)	Extracto de muestra ( $\mu$ L)	Cloroformo ( $\mu$ L)	Cloroformo:metanol 2:1 ( $\mu$ L)
Patrones	Patrón0	0		350	225
	Patrón1	5		350	220
	Patrón2	10		350	215
	Patrón3	15		350	210
	Patrón4	20		350	205
	Patrón5	30		350	195
	Patrón6	40		350	185
	Patrón7	50		350	175
Muestras			350		225

El Chromogen <sup>®</sup> es el reactivo que produce la reacción coloreada y se prepara inmediatamente antes de añadirlo. Para ello, se mezclan 1:1 los reactivos FTS1 <sup>®</sup> y FTS2 <sup>®</sup>.

A todos los tubos, tanto de patrones como de muestras, se les añade 25  $\mu$ L del Chromogen <sup>®</sup> y se agitan. Se deja reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a  $\lambda = 500$  nm de todas las disoluciones, en cubetas resistentes a los disolventes orgánicos. El blanco se ajusta con una mezcla de cloroformo:metanol 5:1 (v/v).

## VALORACIÓN DE TBARS EN PLASMA DE RATA

### REACTIVOS Y MATERIAL

- Ácido Tiobarbitúrico (TBA), Sigma
- Tetramethoxypropane (TMP), Sigma
- HCl 35%
- Ácido tricloroacético (TCA), Fluka
- Agua Destilada
- Fluorímetro, Centrífuga

### DISOLUCIONES PREVIAS

- TCA 100%: Pesar 100 g de ácido tricloroacético y disolver en un poco de agua. Añadir agua hasta completar un volumen final de 100 mL.
- Reactivo TBARS: Pesar 750 mg de TBA, añadir unos 50 mL de agua, 5 mL de HCl, 30 mL de TCA y completar con agua hasta 200 mL. Disolver el TBA, agitando vigorosamente.
- Disolución A: Se pesan exactamente alrededor de 20.525 mg de TMP en matraz aforado de 50 mL, se añaden aproximadamente 40 gotas de HCl y se enrasa con agua.
- Disolución B. En un tubo se pipetea 990  $\mu$ L de agua y se mezclan con 10  $\mu$ L de la disolución A.
- Disolución C: Mezclar en un tubo 500  $\mu$ L de la Disolución B y 500  $\mu$ L de agua.

### TRATAMIENTO DE PATRONES Y MUESTRAS

En tubos nuevos, pipetear (por triplicado):

	Disolución B ( $\mu$ L)	Disolución C ( $\mu$ L)	Plasma ( $\mu$ L)	Agua ( $\mu$ L)
<b>Patrón0</b>	-	-	-	500
<b>Patrón1</b>	-	2	-	498
<b>Patrón2</b>	2	-	-	498
<b>Patrones</b>	<b>Patrón3</b>	5	-	495
	<b>Patrón4</b>	8	-	492
	<b>Patrón5</b>	10	-	490
	<b>Patrón6</b>	20	-	480
<b>Muestras</b>	-	-	100	400

Se añade a todos los tubos 1 mL del Reactivo TBARS previamente preparado y se agitan todos los tubos. Se calienta a 85-90 °C en baño, tomando precauciones para prevenir la luz y la evaporación. Una vez completada la reacción, se agitan vigorosamente los tubos para eliminar las burbujas y se enfrían los tubos en baño de agua. Se centrifugan todos los tubos a 400 g durante 10 min y el sobrenadante se transfiere a cubetas de fluorimetría.

Se lee la fluorescencia a  $\lambda_{ex} = 515$  nm,  $\lambda_{em} = 553$  nm.

## VALORACIÓN DE 8-ISOPROSTANO EN ORINA DE RATA

### REACTIVOS Y MATERIAL

- KOH, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, NaCl P.A., H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% (Panreac).
- Etanol Calidad HPLC.
- Agua ultrapura.
- Tampón EIA ® concentrado, tampón de lavado concentrado, tween 20, patrón de 8-isoprostano, trazador concentrado, antisuero concentrado y Reactivo de Ellman (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, Estados Unidos).
- Columnas de afinidad para 8-isoprostano (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, Estados Unidos).
- Fotómetro lector de placas.
- Evaporador centrífugo

### PURIFICACIÓN DE MUESTRAS

#### DISOLUCIONES PREVIAS

- KOH 15%: Pesar aproximadamente 75 g de KOH en vaso de precipitados, añadir aproximadamente 300 mL de agua y transferir cuantitativamente a matraz aforado de 500 mL, enrasando con agua.
- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.5M: Pesar aproximadamente 101.15 g de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y trasvasar cuantitativamente a matraz aforado de 1 L, enrasando con agua.
- Tampón de columna: Pesar 13.3 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.22 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de NaN<sub>3</sub> y 29.2 g de NaCl. Trasvasar cuantitativamente a matraz aforado de 1 L, enrasando con agua.
- Disolución de elución: Etanol:agua 95:5 (v/v)
- Tampón EIA: Disolver el contenido de un vial de tampón EIA ® concentrado con 90 mL de agua.

#### TRATAMIENTO DE MUESTRA

- Destapar las columnas de afinidad y dejar eluir el tampón.
- Aplicar 1 mL de orina a la columna y lavar sucesivamente con 2 mL de tampón de columna y 2 mL de agua, desechando el líquido eluido.
- Preparar tubos para recoger la siguiente fracción y añadir dos veces 1 mL de disolución de elución, dejando eluir el primer mL antes de añadir el siguiente.
- Evaporar hasta sequedad con vacío en evaporador centrífugo.
- Regenerar las columnas lavando con 5 mL de agua y 5 mL de tampón de columna. Se tapan sin que eluya el tampón.
- Resuspender las muestras en 500 µL de tampón EIA.

### INMUNOENSAYO

#### DISOLUCIONES PREVIAS

- Trazador: Se reconstituye el contenido del vial del trazador concentrado con la cantidad adecuada de tampón EIA.
- Antisuero: Reconstituir el contenido del vial de antisuero concentrado con la cantidad adecuada de tampón EIA.
- Patrón 8-Isoprostano: Tomar 100 µL del *stock* de 8-isoprostano y mezclar con 900 µL de agua. Este es el patrón de trabajo. A partir del patrón de trabajo se preparan 8 diluciones con EIA: la primera, mezclando 100 µL de patrón con 900 µL de tampón y las siguientes, mezclando 500 µL de la disolución anterior con 500 µL de tampón EIA y así sucesivamente, tomando siempre 500 µL de la disolución inmediatamente anterior y mezclando siempre con 500 µL de tampón EIA, hasta tener 8 disoluciones de patrón, en un rango de concentraciones entre 0.5 ng/mL y 0.4 pg/mL.
- Tampón de lavado: Diluir el contenido del vial de lavado en la cantidad adecuada de agua ultrapura y añadir Tween 20 en la proporción correspondiente.

#### DESARROLLO DE LA PLACA

Cada placa debe contener un mínimo de 2 pocillos de blanco (B), dos de actividad total (TA), dos de unión no específica (NSB) y dos de unión máxima (NSB) y se debe analizar cada muestra y patrón en al menos dos pocillos.

Pocillos	Tampón EIA	Patrón	Muestra	Trazador	Antisuero
<b>B</b>					
<b>TA</b>					
<b>NSB</b>	100 µL			50 µL	
<b>B<sub>0</sub></b>	50 µL			50 µL	50 µL
<b>Patrón</b>		50 µL		50 µL	50 µL
<b>Muestra</b>			50 µL	50 µL	50 µL

Una vez añadidos todos los reactivos, se deja incubar durante al menos 18 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan los pocillos al menos 5 veces con tampón de lavado. Cuando esté la placa preparada, se reconstituye el Reactivo de Ellman con la cantidad adecuada de agua y se añaden 200 µL de Reactivo de Ellman a cada pocillo y 5 µL del trazador a los pocillos TA. Se deja reaccionar durante 60-90 min y se lee la placa a  $\lambda = 405-420$  nm.









## APÉNDICE II: PUBLICACIONES



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 823 (1998) 483–487

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

## Short communication

## Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography

F.J. Rupérez, C. Barbas\*, M. Castro, S. Martínez, E. Herrera

*Facultad de CC Experimentales y Técnicas, Universidad S. Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, Ctra. Boadilla del Monte, km 5.3, E-28668 Madrid, Spain*

## Abstract

A method for vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) measurement in rat adipose tissue and mammary gland has been developed and validated. Tissues were homogenized in ethanol–water (1:1) and extracted with *n*-hexane. Vitamin K<sub>1</sub> was used as internal standard. Separation was performed by HPLC with methanol–water (96.5:3.5) as eluent in a Nucleosil C<sub>18</sub> column (15×0.46 cm) at 40°C. Detection was by fluorescence with excitation at 295 nm and emission at 350 nm for vitamin E and at 330 and 440 nm for vitamin K<sub>1</sub>. Standards and tissue extracts were checked for linearity giving correlation coefficients over 0.99 in a range of concentrations from 0.56 to 4.51 nmol/g in adipose tissue and from 2.18 to 17.4 nmol/g in mammary gland tissue. Intra-assay precision (R.S.D.) varied between 3 and 4%, whereas inter-assay precision was between 8 and 9%. Recoveries ranged between 95±3% and 98±11% for the two tissues, respectively. Vitamin E was measured in rats that had previously received one oral dose of this vitamin. Whereas vitamin E content in adipose tissue did not differ between late-pregnant and virgin rats, it was significantly higher in mammary gland of pregnant rats, and this difference could be related to the enhanced lipoprotein lipase activity in this group. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Vitamins; Tocopherols

## 1. Introduction

There is continued interest in the role of vitamin E in cellular metabolism, mainly as antioxidant and preventing free radical mediated diseases [1], and a corresponding interest in easy and reliable methods for assessing its concentration in tissues. Epidemiologic studies have shown that  $\alpha$ -tocopherol, the most biologically active isomer of vitamin E, levels in blood are very variable, being affected by genetic and lifestyle factors, as well as by other nutrient intakes [2]. Since  $\alpha$ -tocopherol is a fat-soluble compound, which is stored in subcutaneous adipose tissue, its concentration in adipose tissue may be a better indicator of its abundance than

plasma levels over a relatively long time, because the former is not affected by rapid changes in the level of plasma lipoproteins nor by acute changes in its intake [3].

The mammary gland is an heterogeneous organ with both adipose and connective components that make it difficult to handle for analysis. Nevertheless, the study of its  $\alpha$ -tocopherol content is an interesting topic under certain conditions, such as late gestation and lactation, where it becomes the main source of vitamin E for the suckling newborn.

A variety of methods have been described for determination of  $\alpha$ -tocopherol isomers. High-performance liquid chromatography (HPLC) separation with fluorescence detection has become the method of choice due to its specificity and sensitivity [4], but since tocopherols are quite sensible to light and air,

\*Corresponding author.

their extraction results in the most critical and time-consuming step in the analytical protocol. Moreover, since tocopherols are fat soluble, their extraction from adipose tissue is difficult. Three different types of extraction methods have been applied: lipid extraction followed by saponification and extraction of the nonsaponifiable lipids [5], direct saponification of the tissue followed by solvent extraction [4,6,7]; or direct  $\alpha$ -tocopherol extraction employing sodium dodecyl sulfate (SDS) [8]. It has been shown that saponification causes extensive loss of tocopherols [9] even when working under protective conditions as in the dark and under nitrogen atmosphere, whereas SDS is difficult to clean-up from the chromatographic columns, substantially decreasing their life-span.

A simple method to measure  $\alpha$ -tocopherol in heart and liver extracts which avoids saponification and the removal of the coeluting lipids has been described [10], but a normal-phase separation was employed with diol columns prepared in the laboratory. A previously reported method based on the direct extraction in *n*-hexane of  $\alpha$ -tocopherol from tissue homogenates by probe sonication, avoiding saponification was applied to liver, brain and placenta [11]. However when applied to adipose tissue or mammary gland, poor recoveries, linearity and reproducibility were obtained due to their high lipidic content. The present study describes a simple way to overcome this problem in rat tissues and consists of carrying out the initial homogenization of the tissues with an ethanol–water mixture. This paper reports the validation of this assay enabling quantification of  $\alpha$ -tocopherol in very small samples (50 mg), which could potentially be applied to needle biopsies.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A Beckman HPLC system provided with a 126 pump, an automatic injector (507e model), a Gold System data processor and a Waters 474 fluorimeter was used. Chromatographic analysis was performed on a 5- $\mu$ m particle C<sub>18</sub> Nucleosil 120 column (15 × 0.46 cm) in a Bio-Rad column oven at 40°C.

### 2.2. Reagents

All solvents were HPLC grade quality purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Vitamin E and K<sub>1</sub> were from Fluka (Madrid, Spain) and all the other reagents were analytical grade from Merck (Madrid, Spain).

### 2.3. Animals and tissue sampling

Lumbar adipose tissue and mammary gland samples for method validation were obtained from rats in our animal quarters. Animals were decapitated and tissues rapidly excised and immediately placed in liquid nitrogen and kept at –80°C until the day of the assay. The method was applied to determine  $\alpha$ -tocopherol in adipose tissue and mammary gland from virgin and 21-day pregnant Wistar rats. These rats received one oral dose of 10 mg  $\alpha$ -tocopherol mixed with 20 mg triolein, 0.5 ml water and 10 mg of Tween 20, 24 h before sacrifice.

### 2.4. Chromatographic analysis

The reversed-phase HPLC solvent conditions were methanol–water (96.5:3.5, v/v) as eluent at a flow-rate of 2 ml/min.

Detection in the tissue extracts was by fluorescence. Excitation was 295 nm and emission, 350 nm in the first 9 min for vitamin E and at 330 nm and 400 nm until the end of the run (min 13) for vitamin K<sub>1</sub>.

### 2.5. Procedure

#### 2.5.1. Stock and working standards

Individual stock solutions of commercial vitamins were prepared in ethanol; and consisted in 8.0 mg/ml vitamin E for external standard and 0.6 mg/ml vitamin K<sub>1</sub> for internal standard. These solutions were stored in aluminum foil-covered containers and kept at –20°C. On the day of the assay working standard solutions were prepared as follows: vitamin E stock solution was diluted 1:250 in ethanol for adipose tissue analysis and 1:100 in ethanol for mammary gland analysis. Actual concentration of the vitamin in the working standard was determined spectrophotometrically at 294 nm and the obtained

value was employed for quantification. Vitamin K<sub>1</sub> stock solution was diluted 1:5 in ethanol for adipose tissue and remained undiluted for mammary gland analysis.

#### 2.5.2. Working standards treatment

In 80×12 mm glass tubes, 50 µl of the working standard of vitamin E, 50 µl of the working standard of vitamin K<sub>1</sub>, 50 µl of ethanol and 100 µl of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, were extracted twice by probe sonication with 1 ml of *n*-hexane, followed by centrifugation at 2000 g for 5 min, at room temperature. The supernatants were pooled together and evaporated to dryness in a centrifuge concentrator (Virtix, USA). The residue was redissolved in 400 µl of chloroform–methanol (1:1, v/v), for adipose tissue, and in 750 µl of chloroform–methanol (1:1, v/v), for mammary gland.

#### 2.5.3. Sample treatment

Approximately 50 mg of either adipose tissue or mechanically grounded powder of mammary gland were exactly weighed and homogenized in a Potter with 10 µl of ethanol–water (1:1) per mg of tissue. A 50-µl volume of the vitamin K<sub>1</sub> working solution was added to 200 µl of tissue homogenate. Vitamins were extracted twice with 1 ml *n*-hexane by probe sonication and centrifuged at 2000 g for 5 min, at room temperature. Supernatants were pooled together and evaporated to dryness in a centrifuge concentrator. The residue was redissolved in 400 µl of chloroform–methanol (1:1, v/v), for adipose tissue, and in 750 µl of chloroform–methanol (1:1, v/v), for the mammary gland.

#### 2.6. Validation

Standard linearity was verified in each case by analysis of duplicates of 12.5, 25, 50, 75 and 100 µl samples of the vitamin E working solution (32 µg/ml for adipose tissue and 80 µg/ml for mammary gland), processed as explained above for working standards. Sample linearity was tested in duplicate of 50, 100, 200, 300 and 400 µl of each tissue homogenized, processed as described above for samples.

Intra- and inter-assay precision was determined in both tissues by processing two six-sample series, of

200 µl of the same homogenate on different days. Standards for quantification were prepared from 50 µl of the working solution and treated simultaneously.

Accuracy was evaluated by processing two series of 100 µl of tissue homogenate, to which 12.5, 25, 50, 75 and 100 µl of the standard vitamin E solution were added for adipose tissue and 12.5, 25, 50, 100 and 150 µl for the mammary gland in order to cover the expected range in samples. In all cases volumes are brought up to 400 µl to give a final ethanol–water proportion of 1:1. A standard curve was processed in parallel to calculate recoveries.

### 3. Results and discussion

Figs. 1–3 show the chromatograms of standards, of adipose tissue and mammary gland extracts, respectively.

Validation results are summarised in Table 1. Both standards and samples show a good linearity, with correlation coefficients over 0.99 in the studied ranges. In adipose tissue a small bias in sample linearity can be observed, and may be explained by the high values of the correlation coefficient ( $r > 0.999$ ) that make a very narrow limit of confidence around the intercept.

Intra- and inter-assay precision show acceptable

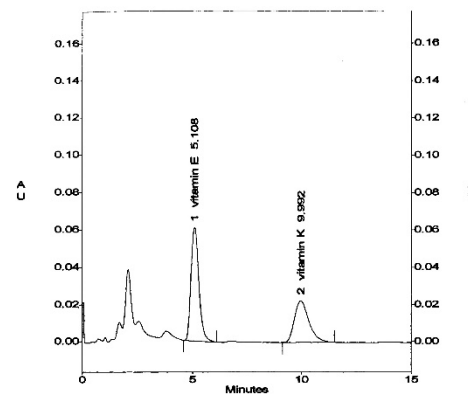


Fig. 1. Chromatogram of the working standard of vitamin E and vitamin K<sub>1</sub> (for details see Section 2).

486

F.J. Rupérez et al. / J. Chromatogr. A 823 (1998) 483–487

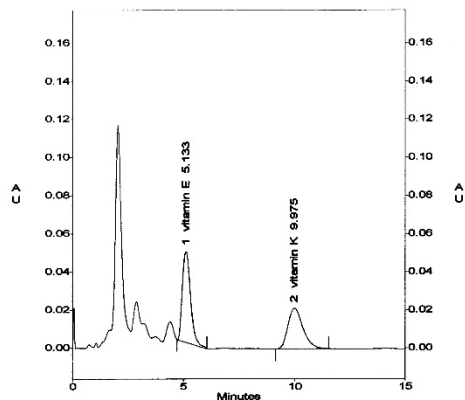


Fig. 2. Chromatogram of vitamin E in adipose tissue (for details see Section 2).

R.S.D. for the level of analyte in samples for both tissues, being higher in the inter-assay than in the intra-assay analysis, as would be expected.

Recoveries are close to 100%. It does not statistically differ from 100% for mammary gland ( $98 \pm 11\%$ ) and it differs but is acceptable in adipose tissue ( $95 \pm 3\%$ ).

So the assayed method is easy to perform as it needs only direct  $\alpha$ -tocopherol extraction from samples, without tedious pretreatment, only a small

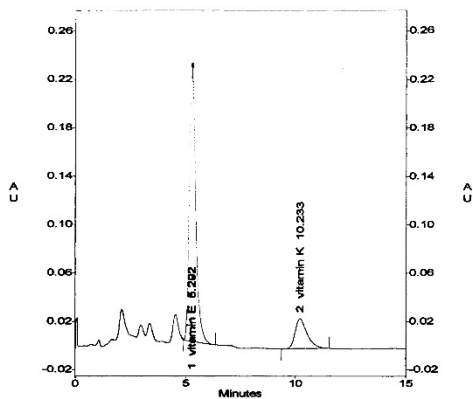


Fig. 3. Chromatogram of vitamin E in mammary gland (for details see Section 2).

Table 1

Validation parameters of vitamin E measurement in rat adipose tissue and mammary gland extracts

	Vitamin E	
	Adipose tissue	Mammary gland
<i>Standard linearity</i>		
Intercept	$-0.003 \pm 0.03$	$0.05 \pm 0.2$
Slope	$0.87 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.02$
<i>r</i>	0.99	0.99
Range (nmol/tube)	0.56–4.51	2.18–17.4
<i>Sample linearity</i>		
Intercept	$-0.15 \pm 0.03$	$0.01 \pm 0.2$
Slope	$0.0132 \pm 7 \cdot 10^{-5}$	$0.16 \pm 6 \cdot 10^{-4}$
<i>r</i>	0.999	0.99
<i>Precision (<math>\mu\text{g/g tissue}</math>)</i>		
<i>Intra-assay</i>		
Mean	57	234
R.S.D. (%)	4	3
<i>Inter-assay</i>		
Mean	53	205
R.S.D. (%)	9	15
<i>Accuracy</i>		
Recovery (%)	95	98
R.S.D. (%)	3	11

amount of sample is used and validation parameters show that it is adequate for quantification.

The following results were found in adipose and mammary gland tissues of virgin and pregnant rats 24 h after receiving one oral dose of vitamin E: vitamin E content in adipose tissue appeared very similar in virgin ( $33.35 \pm 14.5 \mu\text{g/g}$ ) and pregnant rats ( $35.97 \pm 6.4 \mu\text{g/g}$ ), values being in the range given by Bieri and Evarts [12] for tissues from untreated non pregnant Sprague Dawley rats, and higher than those found by Liu and Huang [14] in Long Evans rats. However, a statistically significant (Student test,  $p < 0.05$ ) higher vitamin E content was found in mammary gland from pregnant than virgin rats.

Although there are no previous reports on vitamin E content in mammary gland, present findings fit with the known increased activity of lipoprotein lipase in mammary gland of the late pregnant rat [13]. Since vitamin E is normally transported in blood associated to triglyceride-rich lipoproteins [15], and tissue uptake depends on lipoprotein lipase

activity [16], it has also been proposed that tissue vitamin E uptake depends on the same enzyme [17]. Present results therefore agree with this hypothesis, suggesting that the uptake of vitamin E in mammary gland is enhanced during late pregnancy. Throughout this mechanism, vitamin E from maternal diet becomes available to the suckling newborn.

The unchanged content of vitamin E in adipose tissue in pregnant rat versus virgin rats contrast with the decreased lipoprotein lipase activity known to be present in this tissue during late gestation [18,19], but we have recently found that the gut absorption of vitamin E is more efficient in pregnant than in virgin rats (unpublished results), as it was previously found to be the case for dietary triglycerides [20]. Higher circulating vitamin E levels in pregnant than in virgin rats would therefore compensate for the decreased lipoprotein lipase activity in adipose tissue of pregnant rats, allowing a similar vitamin E content in this tissue in both groups.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from Universidad San Pablo-C.E.U. and from Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Ministerio de Educación y Cultura (PM96-0022).

#### References

- [1] M. Meydani, *Lancet* 345 (1995) 170.
- [2] C.C. Tangney, R.B. Shekelle, W. Raynor, M. Gale, E.P. Betz, *Am. J. Clin. Nutr.* 45 (1987) 764.
- [3] I. Schafer, K. Overvad, *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 486.
- [4] A. Pfälzgraf, H. Steinhart, M. Frigg, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200 (1995) 190.
- [5] K. Helrich, *Official Methods of Analysis*, Association of Analytical Chemists, Arlington, VA, 1990.
- [6] M.C. Erickson, *J. Food. Sci.* 56 (1991) 1113.
- [7] R. Rettenmaier, W. Schüep, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 62 (1992) 312.
- [8] J.K. Lang, K. Gohil, L. Packer, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 106.
- [9] T. Ueda, O. Igarashi, *J. Micronutr. Anal.* 3 (1987) 15.
- [10] J.K.G. Kramer, L. Blais, R.C. Fouchard, R.A. Melnyk, K.M.R. Kallury, *Lipids* 32 (1997) 323.
- [11] C. Barbas, M. Castro, B. Bonet, M. Viana, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 415.
- [12] J.G. Bieri, R.P. Fvarts, *Am. J. Clin. Nutr.* 28 (1975) 717.
- [13] I. Ramírez, M. Llobera, E. Herrera, *Metabolism* 32 (1983) 333.
- [14] J.-F. Liu, C.-J. Huang, *J. Nutr.* 125 (1995) 3071.
- [15] A.K. Dutta-Roy, M.J. Gordon, F.M. Campbell, G.G. Duthie, W.P.T. James, *J. Nutr. Biochem.* 5 (1994) 562.
- [16] M.A. Tasunción, E. Herrera, *Biochem. J.* 210 (1983) 639.
- [17] A. Björneboe, G.E. Björneboe, C.A. Drevon, *J. Nutr.* 120 (1990) 233.
- [18] P. López-Luna, J. Olea, E. Herrera, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* 1215 (1994) 275.
- [19] A. Martín-Hidalgo, P. Holm, P. Belfrage, M.P. Schotz, E. Herrera, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) E930.
- [20] J. Argiles, E. Herrera, *Metabolism* 38 (1989) 104.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 839 (1999) 93–99

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

## Determination of $\alpha$ -tocopherol and $\alpha$ -tocopheryl acetate in diets of experimental animals Study of stability in the diets<sup>☆</sup>

F. Javier Rupérez, Coral Barbas\*, Mario Castro, Emilio Herrera

*Facultad de CC Experimentales y Técnicas, Universidad S. Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, Ctra. Boadilla del Monte, km 5,3, 28668 Madrid, Spain*

Received 28 July 1998; received in revised form 28 December 1998; accepted 28 December 1998

### Abstract

A simple method is described which permits, avoiding saponification,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate measurement in semi-synthetic diets for experimental animals by HPLC, with both UV and fluorescence detection. Phenyldecane was chosen as internal standard with remarkable performances, and EDTA and BHT were added to prevent oxidation in aqueous and non-aqueous phases respectively. The mobile phase was methanol–water (94:6, v/v) at a flow-rate of 2 ml/min. Samples were homogenized and extracted twice with *n*-hexane by probe sonication. Extracts were evaporated to dryness and redissolved with chloroform–methanol (1:1, v/v). Validation parameters were studied between 25 ng and 6  $\mu$ g for  $\alpha$ -tocopherol and between 3 and 24.2  $\mu$ g for  $\alpha$ -tocopheryl acetate, which corresponds to the range of values in the existing diets. Results had correlation coefficients  $>0.99$ ; recoveries  $>85\%$ ; R.S.D. $<6\%$ , so the method is adequate to control vitamin E intake in animals as well as vitamin E stability in food during storage. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Oils; Food analysis; Tocopherol; Tocopheryl acetate; Vitamins; Phenyldecane

### 1. Introduction

The methods followed for tocopherol analysis in foods and feeds are, overall, similar to those used for tissues. Foods or feeds need to be either grounded and extracted directly [1–3] or saponified and extracted [4–10].

Semi-synthetic animal diets used on biochemical and metabolic studies, usually contain free metal

ions, such as copper and manganese, that accelerate oxidation of tocopherols when the diet gets in contact with water in the homogenization step.

Vitamin E is usually present in these diets as  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, and contents must be carefully measured when studying vitamin E concentration in plasma and tissues.

Tocopherols are separated by HPLC on normal-phase [1–3,6,8,9,11–20] or reversed-phase columns [4,7,10,11,21–27] and generally detected by fluorescence, which is more sensitive and selective than UV.

Normal-phase separates all forms of tocopherols, but since reversed-phase is more reproducible and easy to work with and only the  $\alpha$ -isomer was

<sup>☆</sup>Presented at the 27th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry, Lugo, 8–10 July 1998.

\*Corresponding author. Fax: +34-91-3510475.



measured, because it is the most abundant in animals and has the greatest biological activity [28], reversed-phase was selected.

Simultaneous detection with both fluorescence and UV is used since  $\alpha$ -tocopherol is better detected by fluorescence, and  $\alpha$ -tocopheryl acetate has no fluorescence, therefore internal standard with both responses is needed. Moreover, the wide range of  $\alpha$ -tocopherol content found in diets, depending of the type and percentage of fat, sometimes saturated the fluorescence detector, due to the high  $\alpha$ -tocopherol content, and then samples can be measured in less sensitive UV detector, avoiding new dilution and analysis. Other internal standards, such as vitamin A acetate [29] or vitamin K<sub>1</sub> [27] cannot be used because they are also present in the samples.

This paper describes a simple method avoiding saponification, which permits  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate detection, by UV and fluorescence. Phenylododecane was chosen as internal standard with a remarkable performance. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were added to prevent oxidation in aqueous and non-aqueous phases, respectively.

Validation parameters: linearity, intra- and inter-assay precision and accuracy have been determined and stabilities of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in storage conditions have been evaluated.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A Beckman HPLC system provided with a 126 pump, an automatic injector (507c), a 168 diode array detector, a GOLD System data processor and a Waters 474 fluorimetric detector were used. The chromatographic analysis was performed on a 5- $\mu$ m particle C<sub>18</sub> Nucleosil 120 column (15×0.46 cm) kept in a Bio-Rad column oven at 40°C.

### 2.2. Reagents

All solvents were HPLC grade quality purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate were from Fluka (Madrid, Spain), phenylododecane was from Merck (Madrid,

Spain). EDTA and BHT were from Sigma (St. Louis, MO, USA) and all other reagents were analytical grade from Merck.

### 2.3. Methods

The semi-synthetic diet used in the experiment is based in the one previously used in our laboratory [30] and the composition appears in Table 1. Olive oil diet was selected for method development and validation for the intermediate vitamin E content compared to other oils in the diet, as sunflower seed or fish oils.

### 2.4. Procedure

#### 2.4.1. Stock and working standards

Individual stock solutions of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate as external standard, and phenylododecane as internal standard, were prepared at a concentration of 8.0 mg/ml in ethanol. These solutions were stored in aluminium foil-covered containers and kept at -20°C for a period under 15 days. On the day of the assay, the  $\alpha$ -tocopherol solution was diluted 1:200 (v/v) and the  $\alpha$ -tocopheryl acetate 1:33 (v/v), both in ethanol, and a 1:1 (v/v) mixture of both dilutions was used as the working standard. Vitamin concentration in respective dilutions before mixing was determined at 294 nm for  $\alpha$ -tocopherol ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$  71) and 284 nm for  $\alpha$ -tocopheryl acetate ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$  43.5). The phenylododecane stock solution was diluted 1:20 (v/v) in ethanol.

#### 2.4.2. Working standards treatment

In 80×12 mm low-actinic glass tubes, the following reagents were mixed: 50  $\mu$ l of the working standard of  $\alpha$ -tocopherol (0.02 mg/ml) plus  $\alpha$ -tocopheryl acetate (0.12 mg/ml), 50  $\mu$ l of BHT 40 mM (in ethanol), 50  $\mu$ l of ethanol, 50  $\mu$ l of the working solution of phenylododecane (0.4 mg/ml), 200  $\mu$ l of methanol, 100  $\mu$ l of water and 200  $\mu$ l of EDTA 0.1 mM (in water). Tubes were shaken for good homogenization. BHT and EDTA concentrations, and the ethanol-methanol-water (1:1:1.5, v/v/v) proportion was optimized in order to (a) avoid precipitation of BHT in water and of EDTA in ethanol, (b) to ensure a good dissolution of every

Table 1  
Composition of diets

Compound	Mass/4 kg diet
CuSO <sub>4</sub>	0.4 g
ZnSO <sub>4</sub>	0.364 g
MgSO <sub>4</sub>	13.513 g
MnSO <sub>4</sub>	4.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	9.352 g
NH <sub>4</sub> MoO <sub>4</sub>	0.106 g
CaHPO <sub>4</sub>	0.870 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	59.02 g
NaIO <sub>3</sub>	0.0012 g
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	0.114 g
NaCl	16 g
CaCO <sub>3</sub>	39.56 g
Corn starch <sup>a</sup>	2.52 or 2.32 kg
Casein	0.68 kg
Oil (fat) <sup>b</sup>	200 or 400 g
Cellulose	400 g
Complex B+C (Becozyme):	2 tablets
Thiamine (B <sub>1</sub> )	15 mg/tablet
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	15 mg/tablet
Nicotinamide (PP)	50 mg/tablet
Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	10 mg/tablet
Calcium pantothenate (B <sub>5</sub> )	25 mg/tablet
Biotin (H)	150 µg/tablet
Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> )	10 µg/tablet
Ascorbic Acid (C)	200 mg/tablet
Biotin	0.002 g
Folic acid (Acföl)	0.02 g
Vitamin K:	
Fitomenadione (Konaktion)	0.096 g
Menadione	0.003 g
Choline clorohydrate	16 g
Vitamin A:	
Retinol (Auxina A)	50 000 I.U.
Vitamin D <sub>3</sub> :	
Cholecalciferol	0.1312 g
Vitamin E:	
α-Tocopheryl acetate (Auxina E)	400 I.U.

<sup>a</sup> 2.52 kg for 5%-fat diet and 2.32 kg for 10%-fat diet.

<sup>b</sup> The kind of oil or fat is different depending on the experimental group: palm fat (Gracom, Spain), sunflower oil (Koipe, Spain), olive oil 1<sup>st</sup> (Koipe, Spain) or fish oil (Cofares, Spain); 200 g for 5%-fat diet and 400 g for 10%-fat diet.

component prior to extraction, and (c) to get a good separation of phases after extraction.

Extraction of vitamins was performed twice by probe sonication with 1 ml of *n*-hexane, followed by centrifugation at 2000 g for 5 min, at room temperature. Supernatants were pooled and evaporated to dryness in a centrifuge concentrator (Virtix, USA).

The residue was redissolved in 200 µl of chloroform–methanol (1:1, v/v).

#### 2.4.3. Sample treatment

Approximately 100 mg of the non-desiccated diet were exactly weighed, and 50 µl of BHT 40 mM (in ethanol), 100 µl of ethanol, 50 µl of the working solution of phenyldecane, 200 µl of methanol, and 200 µl of EDTA 0.1 mM (in water) were added. Samples were homogenized by probe sonication to make a 'sample homogenate', with ethanol–methanol–water (1:1:1.5, v/v/v) from which vitamins were extracted as described above for working standards.

#### 2.5. Chromatographic analysis

The reversed-phase HPLC analyses were carried out with methanol–water (94:6, v/v) as eluent, at a flow-rate of 2 ml/min.

Fluorescence detection was performed with excitation at 260 nm and emission at 600 nm in the first 8 min for phenyldecane, and at 295 nm and 350 nm until the end of run (min 18) for α-tocopherol. Simultaneous UV detection was at 260 nm in the first 8 min (phenyldecane), at 294 nm until min 11 (α-tocopherol), and 284 nm until the end of run (α-tocopheryl acetate). A 30-min run was allowed for diets containing fish oil, in order to permit elution of vitamin A palmitate, abundant in this type of oil.

Peak identification was performed with retention times as compared with standards and confirmed with characteristic spectra using the photodiode array detector.

#### 2.6. Validation

Standards linearity was verified by the analysis of duplicates of thirteen points in the range of 25.0 ng to 6.0 µg of α-tocopherol and 3.0 to 24.2 µg of α-tocopheryl acetate in order to cover the whole range of concentrations in samples. Solutions were processed as described above for working standards.

Sample linearity for both forms of vitamin E was tested in duplicates of 160, 325, 650, 975 and 1300 µl of 'sample homogenate'. Volumes of all tubes were brought to 1400 µl with the appropriate amount of BHT, ethanol, internal standard, methanol, water

and EDTA to achieve the ethanol-methanol–water (1:1:1.5, v/v/v) proportion in every tube. Subsequent processing was as described above for samples.

Intra- and inter-assay precision was determined by processing two six-sample series of 650  $\mu\text{l}$  of the same homogenate plus internal standard on different days (the homogenate was kept at 4°C and under nitrogen between days). Standards for quantification were prepared from 50  $\mu\text{l}$  of the working solution and treated simultaneously.

For recovery evaluation of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate, an homogenate was prepared with solid diet, BHT, methanol, EDTA and water, arranged in such a way that 550  $\mu\text{l}$  of the homogenate had 50% of the amount of diet and so, 50% of the vitamin E present in a normal sample, and the rest of vitamin E was added as a standard (from 12.5 ng to 3  $\mu\text{g}$  of  $\alpha$ -tocopherol and from 1.5 to 12.1  $\mu\text{g}$  of  $\alpha$ -tocopheryl acetate). The total volumes and proportions were equalled and samples were processed as described above, including the corresponding standards for quantification.

### 2.7. Stability

To test stability, freshly manufactured diets were prepared and divided into 300-g portions, covered with aluminium foil, and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 15 days. On the evening of the 14th day, portions were placed at 4°C until the morning, when six aliquots were tested. The remaining sample was kept for the 2 following days before analysis in a room at  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $55\pm 10\%$  humidity, 1 atm, corresponding to normal animal quarter storage room conditions (1 atm = 101 325 Pa).

To avoid the influence of differences in the water content among samples, results are expressed as micrograms of vitamin per gram of dry mass.

## 3. Results and discussion

Fig. 1 shows some chromatograms from standards and samples with UV and fluorescence detection, evidencing adequate separation of analytes. As there can be seen, a number of unidentified peaks appear in standards chromatograms they correspond to

BHT, EDTA and a minor peak of phenyldodecane in UV and solvent impurities with fluorescence emission plus a minor peak of phenyldodecane in fluorescence.

Validation results appear in Table 2. Both standards and samples show a good linearity, with correlation coefficients over 0.99, except for  $\alpha$ -tocopherol measured with UV in samples, indicating that low levels of  $\alpha$ -tocopherol are better detected with fluorescence.

Intra-assay precision shows R.S.D. ranging between 2.7 and 3.9% and inter-assay R.S.D. ranges between 2.3 and 4.8% which are considered appropriate values for the amount of analyte to be measured. Results are expressed as micrograms of vitamin per gram of dry mass.

Recoveries range between  $88\pm 9$  and  $92\pm 9\%$  (Table 2), indicating an adequate accuracy of the method. Previous studies in our laboratory following the same procedure but without adding EDTA or BHT showed recoveries ranging from 0 to 20% for  $\alpha$ -tocopherol, and near 80% for  $\alpha$ -tocopheryl acetate (unpublished data). This finding shows the need to protect  $\alpha$ -tocopherol from oxidation, which may occur directly in the aqueous interphase in the presence of metals or as a result of the free radical generation and the promotion of lipid peroxidation process started by these metals. According to the present results, these effects seem to be prevented by the presence of EDTA, which is a water soluble metal complexing agent, and BHT, which is soluble in organic solvents and a free radical quencher.

To evaluate the homogeneity of vitamin distribution in the manufactured diets, six aliquots of fresh diet were measured using the proposed method. The R.S.D. values were 7.9% for  $\alpha$ -tocopherol and 6.9% for  $\alpha$ -tocopheryl acetate, which is, as expected, a bit higher than R.S.D. in inter-assay precision, but permits confirmation of a good distribution of both vitamins in the diet.

The content of  $\alpha$ -tocopherol decreased in the diet from day 0 to day 15 of storage [ $29.3\pm 0.9$  to  $15\pm 2$   $\mu\text{g/g}$  (dry mass),  $P<0.001$ ], whereas the amount of  $\alpha$ -tocopherol found at day 17 [ $13.0\pm 0.5$   $\mu\text{g/g}$  (dry mass)] as compared to day 15 was within the limits of confidence for the method.

The content of  $\alpha$ -tocopheryl acetate found in the samples stored for different days was stable

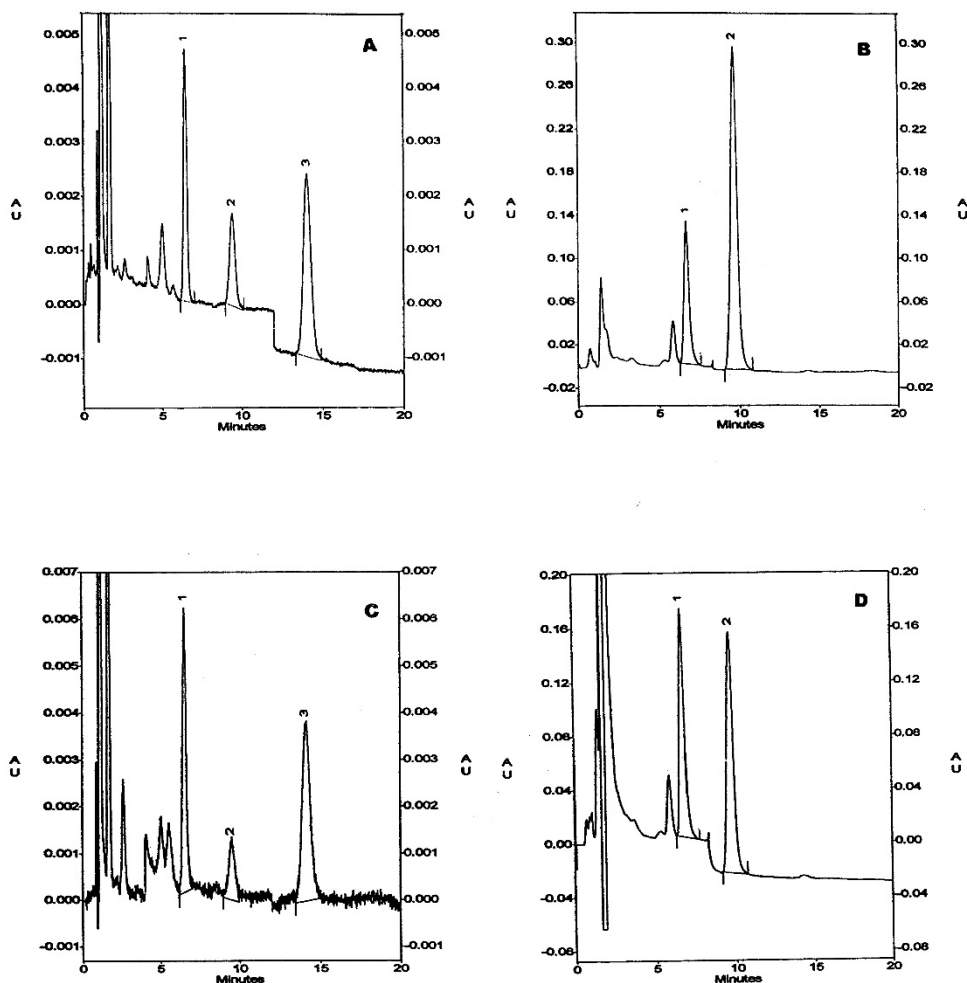


Fig. 1. Chromatograms of (A) standards UV; (B) standards fluorescence; (C) sample UV; (D) sample fluorescence. 1=Phenylododecane; 2= $\alpha$ -tocopherol; 3= $\alpha$ -tocopheryl acetate. HPLC conditions: 40  $\mu$ l volume injected, methanol–water (94:6, v/v) as eluent, at a flow-rate of 2 ml/min. Fluorescence detection: excitation at 260 nm and emission at 600 nm ( $t=0-8$  min) and at 295 nm and 350 nm ( $t=8-18$  min). Simultaneous UV detection was at 260 nm ( $t=0-8$  min), at 294 nm ( $t=8-11$  min) and 284 nm till the end of run.

( $86.8 \pm 2.4$   $\mu$ g/g at day 0,  $87.6 \pm 1.3$  at day 15 and  $81.3 \pm 2.4$  at day 17) and no significant differences were detected as expected, due to the known resistance of  $\alpha$ -tocopheryl acetate to oxidation.

Table 3 shows the  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate content in diets containing 5 or 10% of either palm fat, sunflower, olive and fish oils. Results may vary depending on the brand of oil, since some of

Table 2  
Validation parameters

		$\alpha$ -Tocopherol		$\alpha$ -Tocopheryl acetate
		Fluorescence	Ultraviolet	
Standards linearity	Intercept	0.04±0.02	-0.009±0.009	0.01±0.02
	Slope	0.627±0.007	0.164±0.001	0.112±0.001
	<i>r</i>	0.999	0.999	0.995
	Range ( $\mu$ g/tube):	0.025 3.0	0.1 6.0	3.0 24.2
Samples linearity	Intercept:	0.02±0.03	0.005±0.04	0.02±0.05
	Slope	0.0181±0.0003	0.0400±0.0003	0.0136±0.0003
	<i>r</i>	0.999	0.982	0.998
Precision ( $\mu$ g/dry g)	Mean	17.0	15.9	89.1
	R.S.D. (%)	3.6	3.9	2.7
Inter-assay	Mean	16.5	15.9	89.5
	R.S.D. (%)	4.8	4.1	2.3
Accuracy	Recovery (%)	88	92	89
	R.S.D. (%)	8.8	9.2	6.9

Table 3  
Vitamin E content in diets<sup>a</sup>

	$\alpha$ -Tocopherol ( $\mu$ g/dry g)	$\alpha$ -Tocopheryl acetate ( $\mu$ g/dry g)	Vitamin E (I.U./dry g)
Palm 5%	0.57±0.03	75.4±4.3	76.2±4.3
Olive 5%	18.0±1.9	45.5±0.5	72.3±2.6
Olive 10%	25.8±0.7	53.3±5.7	91.7±5.7
Sunflower 5%	63.3±7.1	38.6±5.7	132.9±16.3
Sunflower 10%	177.7±8.3	27.6±2.5	292.3±14.9
Fish 10%	3.2±0.6	55.9±3.9	60.7±5.4

<sup>a</sup> Results are expressed as mean±S.D.

them have  $\alpha$ -tocopheryl acetate added, and with the degree of rancidity of the oil. These differences must be considered when studying the effect of diets on vitamin E stability in animals. Results shown in Table 3 are also expressed as total vitamin E activity, considering that 1 I.U. is referred to as 1 mg of the synthetic form, racemic  $\alpha$ -tocopheryl acetate, and 1 mg of the natural form of D- $\alpha$ -tocopherol has a biopotency of vitamin E equal to 1.49 I.U. [28].

#### 4. Conclusion

A method to measure  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in semi-synthetic diets of experimental animals in presence of metallic ions and

other vitamins has been developed and validated, involving EDTA, as a water soluble metal quellant, and BHT, as a free radical quencher, in order of preventing  $\alpha$ -tocopherol oxidation, and phenyldodecane as the internal standard which responds both to UV and fluorescence detectors. This method has been used to determine these two forms of vitamin E in diets prepared with different levels and types of fat or oil and to study their stability in experimental conditions.

#### Acknowledgements

The present study has been supported by grants from the Universidad San Pablo-CEU (project No

12/97) and from DGICYT (project No. PM96-0022).

## References

- [1] J.K.G. Kramer, L. Blais, R.C. Fouchard, R.A. Melnyk, K.M.R. Kallury, *Lipids* 32 (1997) 323.
- [2] J.N. Thompson, G. Hatina, *J. Liq. Chromatogr.* 2 (1979) 327.
- [3] C.G. Rammell, A.B. Pearson, G.R. Bentley, *N. Z. Vet. J.* 36 (1988) 136.
- [4] H.E. Indyk, *Analyst* 113 (1988) 1217.
- [5] E.J. Konings, H.H. Roomans, P.R. Beljaars, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 902.
- [6] V. Piironen, P. Varo, E.-L. Syvaöja, K. Salminen, P. Koivistoinen, *Int. J. Nutr. Vit. Res.* 54 (1984) 35.
- [7] C.H. McMurray, W.J. Blanchflower, *J. Chromatogr.* 176 (1979) 488.
- [8] W.M. Cort, T.S. Vicente, E.H.W.B.D. Wayseck, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 1330.
- [9] W.D. Pocklington, A. Diefenbacher, *Pure Appl. Chem.* 60 (1988) 877.
- [10] C.J. Hogarty, C. Ang, R.R. Eitenmiller, *J. Food. Compos. Anal.* 2 (1989) 200.
- [11] B.J. Zaspel, A.S. Csallany, *Anal. Biochem.* 130 (1983) 146.
- [12] G.W. Burton, A. Webb, K.U. Ingold, *Lipids* 20 (1985) 29.
- [13] E.-L. Syvaöja, K. Salminen, V. Piironen, P. Varo, O. Kerojoki, P. Koivistoinen, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62 (1985) 1245.
- [14] Y.K. Chung, D.C. Mahan, A.J. Lepine, *J. Anim. Sci.* 70 (1992) 2485.
- [15] P. Taylor, P. Barnes, *Chem. Ind.* 1981 (1981) 722.
- [16] W. Müller-Mulot, G. Rohrer, G. Oesterhelt, K. Schmidt, L. Allemann, R. Maurer, *Fette Seifen Anstrichm.* 85 (1983) 66.
- [17] C.G. Rammell, J.J.L. Hoogenboom, *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 707.
- [18] G.W. Chase Jr, C.C. Akoh, R.R. Eitenmiller, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 877.
- [19] Y. Shindo, E. Witt, D. Han, W. Epstein, L. Packer, *J. Invest. Dermatol.* 102 (1994) 122.
- [20] J.T. Budin, W.M. Breene, D.H. Putnam, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 309.
- [21] S.N. Meydani, A.C. Shapiro, M. Meydani, J.B. Macauley, J.B. Blumberg, *Lipids* 22 (1987) 345.
- [22] T. Udea, O. Igarashi, *J. Micronutr. Anal.* 3 (1987) 15.
- [23] E. Berlin, D. McClure, M.A. Banks, R.C. Peters, *Comp. Biochem. Physiol.* 109A (1994) 53.
- [24] D.W. Alexander, S.O. McGuire, N.A. Cassity, K.L. Fritsche, *J. Nutr.* 125 (1995) 2640.
- [25] E.J. Wang, Y. Li, M. Lin, L. Chen, A.P. Stein, K.R. Reuhl, C.S. Yang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136 (1996) 146.
- [26] K. Warner, T.I. Mounts, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 827.
- [27] C. Barbas, M. Castro, B. Bonet, M. Viana, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 415.
- [28] T. Leth, H. Sondergaard, *J. Nutr.* 107 (1977) 2236.
- [29] D. Cuesta, M. Castro, *J. Chromatogr.* 380 (1986) 140.
- [30] A. Soria, A. Chicco, N. Mocchiutti, R.A. Gutman, Y.B. Lombardo, A. Martín-Hidalgo, E. Herrera, *J. Nutr.* 126 (1996) 2481.

## Nutrition and Postnatal Development

### Low Arachidonic Acid Rather than $\alpha$ -Tocopherol Is Responsible for the Delayed Postnatal Development in Offspring of Rats Fed Fish Oil Instead of Olive Oil during Pregnancy and Lactation<sup>1</sup>

Encarnación Amusquivar, Francisco J. Rupérez, Coral Barbas and Emilio Herrera<sup>2</sup>

*Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo-CEU, E-28668 Boadilla del Monte (Madrid), Spain*

**ABSTRACT** This study was designed to compare in rats the effects of dietary fish oil and olive oil during pregnancy and lactation on offspring development, fatty acid profile and vitamin E concentration. From d 0 of pregnancy, female Sprague-Dawley rats were divided into two groups that were fed purified diets that differed only in their nonvitamin lipid components. One diet contained 10 g fish oil/100 g diet (FOD), whereas the other contained 10 g olive oil/100 g diet (OOD). At d 20 of gestation, maternal adipose tissue fatty acid profile did not differ between rats fed the two diets, whereas both maternal and fetal plasma and liver arachidonic acid (AA) contents were proportionally lower and eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid contents were higher in the FOD group than in the OOD group.  $\alpha$ -Tocopherol concentration was lower in maternal and fetal plasma, liver and brain in the FOD group than in the OOD group. The postnatal increase in body weight and length was less and body and psychomotor maturation indices were delayed in pups from FOD-fed dams compared with those from OOD-fed dams. This difference was maintained when pups were cross-fostered at birth, with the delay in postnatal development present in the pups suckling dams fed FOD during lactation. At age 21 d, pups suckling dams fed FOD had lower AA and higher EPA and DHA concentrations in brain phospholipids. Although  $\alpha$ -tocopherol in plasma and liver was lower in pups suckling dams fed FOD rather than OOD, brain  $\alpha$ -tocopherol concentrations did not differ. Milk yield and milk  $\alpha$ -tocopherol and AA concentrations were lower and EPA and DHA were higher in the milk of dams fed FOD compared with those fed OOD. Postnatal development indices and the proportion of plasma, liver and brain AA concentrations, although not plasma, liver and brain  $\alpha$ -tocopherol concentrations, recovered to the values found in dams fed OOD when the FOD was supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid. However, postnatal development indices were not recovered when the FOD was supplemented with sufficient exogenous vitamin E to increase plasma and liver  $\alpha$ -tocopherol concentrations above those in dams fed OOD. Thus, although feeding FOD during pregnancy and lactation decreases both  $\alpha$ -tocopherol and AA concentrations, the latter deficiency rather than the former seems to be responsible for delayed postnatal development of rat pups. *J. Nutr.* 130: 2855–2865, 2000.

**KEY WORDS:** • fish oil diet • olive oil diet • arachidonic acid •  $\alpha$ -tocopherol • rats

Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA)<sup>3</sup> are essential to normal growth and development. Docosahexaenoic [DHA, 22:6(n-3)] and arachidonic [AA, 20:4(n-6)] acids are vital components of phospholipid membranes that make up the structural matrix of cell membranes and are deposited in the central nervous system during brain growth (Arbuckle and Innis 1992, Clandinin et al. 1980, Jumpson and Clandinin 1995). DHA is of major importance for the developing infant because is a major part of the total fatty acids in cerebral cortex and retina phospholipids (Clandinin et al. 1980, Fleisler and

Anderson 1983), and AA is the precursor of prostaglandins and leukotrienes (Zurier 1993) and is essential for neonatal growth (Carlson et al. 1992). During pregnancy, these fatty acids are transported from maternal circulation across the placenta (Ruyle et al. 1990), and the fatty acid composition of developing neural tissues can be altered in animals through changes in prenatal and/or postnatal dietary fatty acid composition (Arbuckle and Innis 1992, Carlson et al. 1986, Yonekubo et al. 1993). These alterations affect neurodevelopment as shown by changes in several neurochemical and behavioral variables (Saste et al. 1998) and learning ability (Suzuki et al. 1998, Yonekubo et al. 1994). Excess intake of (n-3) fatty acids, such as that caused by high dietary concentrations of fish oil, decreased the endogenous concentrations of AA (Bourre et al. 1988 and 1990) due to an inhibitory effect on  $\Delta 6$  desaturase activity (Raz et al. 1997). Dietary supplementation with fish oil is still controversial. High dietary fish oil consumption during pregnancy in rats has been shown to

<sup>1</sup> Supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (99/0205) and Universidad San Pablo-CEU (6/99 and 10/99) of Spain and from the European Community (FATLINK, FAIR-CT-98-4141).

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

<sup>3</sup> Abbreviations used: AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; FOD, fish oil diet; FOD- $\gamma$ L, fish oil diet supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid; FOD-VE, fish oil diet supplemented with vitamin E; OOD, olive oil diet; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

2856

AMUSQUIVAR ET AL.

**TABLE 1**  
Composition of the diets

Ingredient	Olive oil diet	Fish oil diet (FOD)	FOD plus $\gamma$ -linolenic acid	FOD plus arachidonic acid	FOD plus vitamin E
	g/kg				
Casein	170	170	170	170	170
Salt mix <sup>1</sup>	35	35	35	35	35
Vitamin mix <sup>2</sup>	10	10	10	10	10
Choline chloride	4	4	4	4	4
Cellulose	100	100	100	100	100
Cornstarch	580	580	580	580	580
Olive oil	100	—	—	—	—
Fish oil	—	100	80	80	100
Borage oil	—	—	20	—	—
ARASCO <sup>3</sup>	—	—	—	20	—
<i>dl</i> - $\alpha$ -Tocopherol acetate	0.1	0.1	0.1	0.1	1

<sup>1</sup> Salt mix (g/kg diet): copper sulfate 0.1, ammonium molybdate 0.026, sodium iodate 0.0003, potassium chromate 0.028, zinc sulfate 0.091, calcium hydrogen phosphate 0.145, ammonium ferrous sulfate 2.338, magnesium sulfate 3.37, manganese sulfate 1.125, sodium chloride 4, calcium carbonate 9.89 and potassium dihydrogen phosphate 14.75.

<sup>2</sup> Vitamin mix (mg/kg diet): retinyl palmitate 2.4, cholecalciferol 0.025, menadione sodium bisulfite 0.8, biotin 0.22, cyanocobalamin 0.01, riboflavin 6.6 and thiamine hydrochloride 6.6.

<sup>3</sup> ARASCO, high-arachidonic acid oil from the unicellular fungus *Mortierella alpina*.

improve postnatal learning ability (Yonekubo et al. 1994), and women have been advised to increase the consumption of sardines and fish oil during pregnancy to promote higher concentrations of DHA in the newborn infant (Connor et al. 1996). In addition, fetal DHA reserves have been improved by supplementing pregnant women with fish oil during the last trimester of pregnancy (Van Houwelingen et al. 1995). However, several studies have shown that postnatal supplementation with marine oil led to impaired growth, resulting in lower

weight, length and head circumference (for a review on the subject, see Hamosh 1998), an effect that was related to the lower AA concentrations (Carlson and Werkman 1993).

Excess intake of PUFA enhances lipid peroxidation (Berry et al. 1991) and reduces antioxidant capacity (Cho and Choi 1994), enhancing susceptibility to oxidative damage (Mazière et al. 1998), a condition that during pregnancy may be responsible for fetal damage (Simán and Eriksson 1997, Viana et al. 1996). Therefore, the potential negative effect on offspring of high dietary fish oil intake during pregnancy could be affected not only by decreased AA concentrations but also by decreased vitamin E concentrations. On the contrary, dietary olive oil protects the (n-3) PUFA series (Navarro et al. 1994), which have been shown not to affect AA concentrations (Girón et al. 1989, Periago et al. 1990, Rao et al. 1993) and consequently have been proposed to be taken into account in nutritional recommendations (Bourre et al. 1997). In addition, monounsaturated fatty acids are much more resistant to lipid peroxidation (Berry et al. 1991, Öztecan et al. 1996, Scaccini et al. 1992), and therefore their abundance in the diet could be protective against the loss of vitamin E, which is the main lipophilic antioxidant vitamin.

Therefore, the present study in rats was designed to compare the effects of a diet supplemented during pregnancy and lactation with fish oil versus olive oil on the fatty acid profile and vitamin E concentration of the offspring. Because a decreased postnatal growth rate, as well as a decrease in both AA and vitamin E concentrations, was found in the offspring of rats fed the fish oil-rich diet, the study was extended to determine whether dietary supplementation with either vitamin E, AA or  $\gamma$ -linolenic acid [18:3(n-6)], as a precursor of AA, could ameliorate these changes, as well as to determine whether the cross-fostering between the offspring and dams during lactation would affect the response.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and diets

Female Sprague-Dawley rats from our animal quarters were initially fed a standard nonpurified diet (B&K Universal, Barcelona, Spain) and housed under controlled light and temperature conditions

**TABLE 2**  
Fatty acid composition and vitamin E concentration of the diets

	Olive oil diet	Fish oil diet	Fish oil diet- $\gamma$ -linolenic acid	Fish oil diet-arachidonic acid	Fish oil diet-Vitamin E
	g/100 g fatty acids				
Fatty acid					
12:0	0.31	0.01	0.01	0.01	0.01
14:0	0.33	4.11	2.63	3.40	5.40
16:0	10.87	20.66	12.85	15.30	21.64
18:0	3.59	3.48	4.38	6.41	6.19
16:1(n-7)	0.95	6.38	5.45	6.37	8.67
18:1(n-9)	74.83	23.33	23.21	26.17	33.30
18:2(n-6)	7.39	0.01	7.50	4.04	2.50
18:3(n-6)	0.01	0.01	8.13	0.72	0.01
20:4(n-6)	0.01	0.01	0.01	9.60	0.01
20:5(n-3)	0.04	9.54	8.27	7.54	5.49
22:6(n-3)	0.01	11.44	12.38	10.28	10.06
	mmol/kg				
$\alpha$ -Tocopherol	0.14 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.05	1.75 $\pm$ 0.03



## DIETARY FISH/OLIVE OILS IN PREGNANCY/LACTATION

2857

TABLE 3

Fatty acid composition of maternal plasma, adipose tissue and liver and fetal plasma and liver at d 20 of gestation in rats fed fish oil diet (FOD) or olive oil diet (OOD) during pregnancy<sup>1</sup>

Fatty acid	Dams						Fetuses <sup>2</sup>			
	Plasma		Adipose tissue		Liver		Plasma		Liver	
	FOD	OOD	FOD	OOD	FOD	OOD	FOD	OOD	FOD	OOD
	<i>g/100 g fatty acids</i>									
12:0	0.59 ± 0.09	0.28 ± 0.13	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.05	0.30 ± 0.08	0.25 ± 0.04	1.03 ± 0.29	0.82 ± 0.11	0.42 ± 0.07	0.37 ± 0.08
14:0	1.29 ± 0.40	0.79 ± 0.17	3.05 ± 0.19**	1.15 ± 0.06	0.26 ± 0.07	0.40 ± 0.08	2.19 ± 0.10	1.83 ± 0.23	0.97 ± 0.14	1.52 ± 0.12
16:0	17.6 ± 1.4	19.2 ± 1.9	26.0 ± 4.5	21.2 ± 0.7	23.8 ± 2.5	21.0 ± 1.8	44.3 ± 1.0*	31.7 ± 3.9	29.6 ± 2.8	31.8 ± 1.6
18:0	11.4 ± 0.4	10.4 ± 1.4	4.09 ± 0.45	2.99 ± 0.21	20.1 ± 2.0	16.1 ± 1.5	16.4 ± 1.9	12.1 ± 1.3	16.2 ± 0.6**	11.6 ± 0.4
16:1(n-7)	3.57 ± 0.07	1.91 ± 0.17	10.9 ± 0.7**	4.69 ± 0.26	1.59 ± 0.39	1.54 ± 0.21	3.78 ± 0.32	4.11 ± 0.55	3.27 ± 0.27	3.67 ± 0.39
18:1(n-9)	20.0 ± 0.8*	33.7 ± 6.1	38.7 ± 3.7**	59.6 ± 1.0	12.4 ± 1.0**	29.3 ± 2.6	19.7 ± 1.2	25.8 ± 3.4	17.1 ± 1.3*	26.1 ± 1.7
18:2(n-6)	12.7 ± 0.5	8.49 ± 1.76	8.26 ± 0.61	8.92 ± 0.48	3.40 ± 0.64	4.29 ± 0.11	3.61 ± 0.34**	4.49 ± 0.83	3.01 ± 0.22	4.42 ± 0.49
20:4(n-6)	2.30 ± 0.40*	9.41 ± 2.32	0.19 ± 0.07	0.12 ± 0.04	3.87 ± 0.52†	15.4 ± 3.3	0.84 ± 0.84*	11.1 ± 3.8	2.82 ± 0.38*	7.64 ± 0.58
20:5(n-3)	4.98 ± 0.76†	0.74 ± 0.59	1.72 ± 0.32†	0.16 ± 0.11	7.95 ± 0.97**	0.98 ± 0.60	2.23 ± 0.62	0.74 ± 0.74	8.01 ± 0.39*	4.04 ± 0.74
22:6(n-3)	7.11 ± 1.41†	1.30 ± 0.11	4.24 ± 0.52**	0.01 ± 0.01	24.7 ± 0.7**	4.55 ± 0.44	2.77 ± 0.38	1.37 ± 0.79	16.7 ± 0.8**	3.55 ± 0.53

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM, *n* = 5. Statistical comparison between the OOD and the FOD was made with the Student's *t* test. \**P* < 0.05, †*P* < 0.01, \*\**P* < 0.001.

<sup>2</sup> Samples from all of the fetuses of the same dam were pooled and used as an experimental unit.

(12-h light/dark cycle; 22 ± 1°C). The experimental protocol was approved by the Animal Research Committee of the University San Pablo-CEU in Madrid, Spain. Rats were mated when they weighed 180–190 g, and on the day in which spermatozooids were found in vaginal smears (d 0 of pregnancy), they were divided into two groups that were fed purified diets that differed only in the nature of the nonvitamin lipid component: one contained 10 g fish oil/100 g diet acids (FOD) and the other contained 10 g olive oil/100 g diet (OOD). The composition of these diets and their proportional fatty acid contents are shown in Tables 1 and 2. Both diets contained a similar amount of vitamin E (Table 2); they both were isoenergetic (both providing ~16.24 kJ/g) and were fed to the rats on an ad libitum basis. Diets were prepared at the onset of the experiments and were divided into daily portions that were kept at -20°C until use. Dams were housed in collective cages (four per cage) and had free access to the assigned diet and tap water. Fresh food was provided every 24 h, and the daily food intake was estimated periodically.

**Experiment 1.** Some rats from each group were decapitated on d 20 of pregnancy and/or after the start of the diet, and trunk blood was collected into receptacles containing 1 g of Na<sub>2</sub>-EDTA/L. The two uterine horns were immediately dissected and weighed with their contents to obtain the whole "conceptus" weight. Livers and lumbar adipose tissues were quickly removed and placed in liquid nitrogen before freezing at -80°C until analysis. Fetuses were weighed and

decapitated, and the blood, brain and liver were collected as indicated earlier. Samples from all of the fetuses of the same dam were pooled separately and processed in parallel to the samples of the adults.

**Experiment 2.** Another set of pregnant rats fed either FOD or OOD as described were allowed to spontaneously deliver. Litters were adjusted to eight pups that suckled their dams. Pups and dams were fed freely the corresponding diet throughout the lactation period. The body weight and length (crown-to-rump length) were measured at different days of age. Opening of the eyelids, opening of the ear and the acquisition of both the surface righting reflex (SRR) and the air

TABLE 4

Effect of fish oil diet (FOD) and olive oil diet (OOD) during pregnancy on α-tocopherol levels in the rats<sup>1</sup>

α-Tocopherol level	FOD	OOD
Dam		
Plasma, μmol/L	15.2 ± 2.3	27.7 ± 3.0*
Fetus <sup>2</sup>		
Plasma, μmol/L	3.02 ± 0.23	7.31 ± 0.46†
Liver, μmol/kg	23.2 ± 2.1	61.8 ± 5.1†
Brain, μmol/kg	13.9 ± 0.7	19.1 ± 0.7†

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM. Differences between OOD (*n* = 5) and FOD (*n* = 5) groups are indicated by the *P* values.

<sup>2</sup> Samples from all of the fetuses of the same dam were pooled and used as an experimental unit.

\**P* < 0.01, †*P* < 0.001.

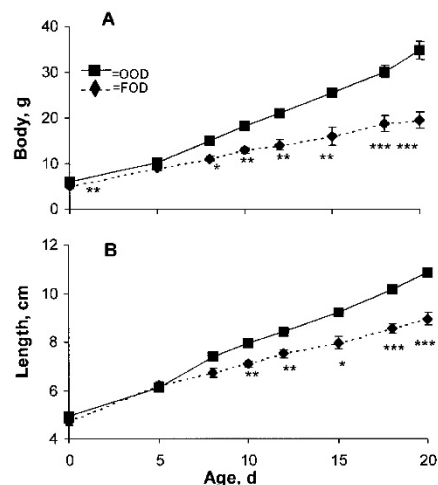
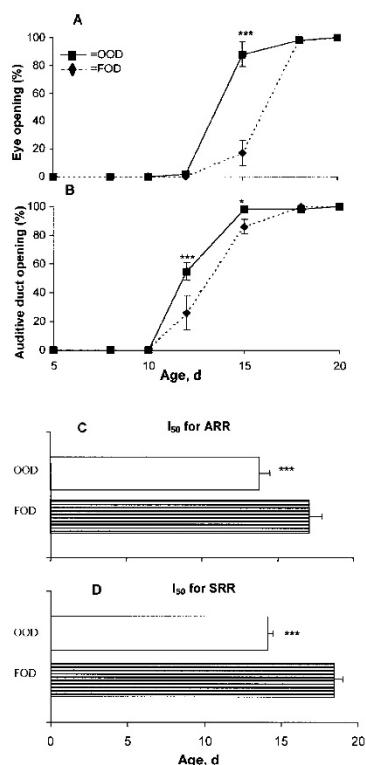


FIGURE 1 Body weight (A) and length (B) in newborn pups of rats fed fish oil diet (FOD) or olive oil diet (OOD) during gestation and lactation (expt. 2). Mean of all pups from each litter was used as experimental unit, and values are means ± SEM, *n* = 6 or 7 litters. Significant difference between the groups: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001.

2858

AMUSQUIVAR ET AL.



**FIGURE 2** Acquisition of eyelid (A) and ear opening (B) expressed as the percentage of pups per litter attaining mature response, and air righting (ARR) (C) and surface righting (SRR) reflexes (D) expressed as the day that 50% of the litter acquired the mature response ( $I_{50}$ ) in offspring of rats fed fish oil diet (FOD) or olive oil diet (OOD) (expt. 2). Mean of all pups from each litter was used as experimental unit, and values are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  or 7 litters. Significant difference between the groups, \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

righting reflex (ARR) were tested as described previously (Lopez Tejero et al. 1986) on the appropriate days until the age of 20 d. Results are expressed as the cumulative percentage of pups per litter attaining mature responses. Dams and pups were decapitated as described at d 21 after delivery. The brains and livers of each pup were rapidly removed, placed into liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed.

**Experiment 3.** Another set of rats were fed the same diets as described earlier during pregnancy and lactation, and milk yield was estimated from pup weight and weight gain on d 7–8 and 14–15 of lactation as described previously (Sampson and Jansen 1984). On d 10, after being separated from their litters, dams were anesthetized with 0.5 mL/200 g of a cocktail containing 9 mg ketamine (Imalgene 500; Rhone Merieux, Lyon, France) and 0.25 mg chlorpromazine (Largactil; Rhone Poulenc, Madrid, Spain) administered intraperitoneally. The rats were injected intraperitoneally with 0.25 mL/200 g of a solution of oxytocin (2000 IU/L Syntocinón; Novartis Farmaceutica, Barcelona, Spain), and milk was obtained with gentle hand stripping of the teats. An aliquot of milk was immediately placed into chloroform/methanol (2:1) for lipid extraction (Folch et al. 1957), and another aliquot was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processed.

**Experiment 4.** Another set of rats were fed FOD or OOD during pregnancy and lactation, but at the time of delivery, litters were cross-fostered. Thus, pups of dams fed FOD suckled dams fed OOD (FOD-OOD), and pups of dams fed OOD suckled dams fed FOD (OOD-FOD). Other litters were allowed to suckle from different dams that had been fed the same diet as were fed their actual dams during pregnancy (FOD-FOD and OOD-OOD), and all pups were studied in parallel. Litter size was always kept to eight per dam. Body weight, length and the different maturation tests were studied as described, and the dams and pups from all of the groups were decapitated on d 21 of lactation according to the same protocol described earlier.

**Experiment 5.** Other rats were fed modified FOD during pregnancy and lactation. FOD was supplemented with 1 g of *dl*- $\alpha$ -tocopherol acetate/kg (FOD-VE), or the fish oil content was reduced to 8% and the diet was supplemented with 2% borage oil (Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden) with a  $\gamma$ -linolenic acid [18:3(n-6)] content of  $>40\%$  (FOD- $\gamma$ L) or with ARASCO (Martek Biosciences, Columbia, MD), which is a triglyceride oil that contains  $>40\%$  AA, no (n-3) fatty acids and small amounts of other long-chain PUFA (FOD-AA) (Tables 1, 2). The vitamin E contents in these diets were similar except for FOD-VE, in which the vitamin E was  $>10$  times higher than that of any of the other diets. In this experiment, pups were allowed to suckle their dams, and body and psychomotor maturation were studied as described earlier, with the pups killed on d 21 after delivery.

#### Processing of samples

Lipid extraction and purification (Folch et al. 1957) were carried out with fresh aliquots of each diet, as well as with plasma (separated from fresh blood through centrifugation at  $1500 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), milk, frozen livers, adipose tissues and brains. Phospholipids were separated through thin layer chromatography in Silicagel 60 F<sub>254</sub> as described elsewhere (Ruiz and Ochoa 1997). Spots corresponding to phospholipids were eluted with methanol/toluene (4:1). Total lipid or phospholipid fatty acids were simultaneously saponified and methylated according to the method of Lepage and Roy (1984 and 1986). Fatty acid methyl esters were separated and quantified on a Perkin-Elmer gas chromatograph (Autosystem; Norwalk, CT) with a flame ionization detector and a  $30\text{-m} \times 0.25\text{-mm}$  Omegawax capillary column. Nitrogen was used as carrier gas, and the fatty acid methyl esters were compared with purified standards (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Individual fatty acids are expressed as percent of total fatty acids in the sample.

$\alpha$ -Tocopherol was measured in plasma, milk, liver and brain samples through HPLC, according to methods previously described (Barbas et al. 1997, Barbas and Herrera 1998).  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate were measured in fresh diets (Rupérez et al. 1999) and expressed as  $\alpha$ -tocopherol.

#### Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Treatment effects (diet) were analyzed by one-way ANOVA with Systat Version 5.03a (Wilkinson, Evanston, IL). When treatment effects were significantly different ( $P < 0.05$ ), means were tested by Tukey's test, and linear regressions were calculated by the least-squares method (Quaresima et al. 1996). Differences between two groups were analyzed by Student's *t* test. Significance was set at the  $\alpha = 0.05$  error rate.

## RESULTS

Neither the dam weight change during gestation nor the number of fetuses per litter or fetal weight on d 20 of gestation differed between groups (data not shown).

The fatty acid composition of plasma of rats fed FOD contained significantly less oleic acid [18:1(n-9)] and AA [20:4(n-6)] and more DHA [22:6(n-3)] and eicosapentaenoic acid [EPA, 20:5(n-3)] than the plasma of rats fed OOD (Table 3). A similar difference in the proportion of fatty acids was seen in both maternal liver and lumbar adipose tissue, except

DIETARY FISH/OILIVE OILS IN PREGNANCY/LACTATION

2859

TABLE 5

Fatty acid profile and vitamin E concentration in plasma, liver and brain of 21-d-old rats that suckling dams fed either fish oil diet (FOD) or olive oil diet (OOD) during pregnancy and lactation<sup>1</sup>

Fatty acid	Plasma, total fatty acids		Liver, total fatty acids		Brain, phospholipid fatty acids	
	FOD	OOD	FOD	OOD	FOD	OOD
	<i>g/100 g fatty acids</i>					
12:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
14:0	0.80 ± 0.17	0.69 ± 0.07	1.17 ± 0.22	1.58 ± 0.10	0.59 ± 0.04†	0.41 ± 0.04
16:0	20.1 ± 0.6	18.2 ± 1.2	20.5 ± 1.1	18.5 ± 0.2	26.8 ± 1.3	25.3 ± 1.1
18:0	11.4 ± 1.3	11.1 ± 0.9	12.6 ± 0.7*	10.8 ± 0.4	23.3 ± 0.3	22.1 ± 0.9
16:1(n-7)	2.33 ± 0.18†	1.66 ± 0.11	1.90 ± 0.27	1.92 ± 0.29	1.03 ± 0.06	0.88 ± 0.12
18:1(n-9)	19.7 ± 1.1**	39.4 ± 1.9	16.1 ± 1.3**	44.0 ± 1.0	14.0 ± 1.4	13.5 ± 0.6
18:2(n-6)	7.05 ± 0.56**	10.8 ± 0.4	4.17 ± 0.26†	5.50 ± 0.20	0.71 ± 0.02	0.60 ± 0.05
20:4(n-6)	4.51 ± 0.34**	13.0 ± 1.3	4.03 ± 0.35**	9.72 ± 0.32	6.46 ± 0.25**	11.7 ± 0.5
20:5(n-3)	13.0 ± 1.8**	0.66 ± 0.32	7.24 ± 0.17**	1.05 ± 0.58	3.98 ± 0.74*	1.77 ± 0.49
22:6(n-3)	11.0 ± 1.3**	1.24 ± 0.11	26.4 ± 1.1**	2.33 ± 0.15	17.4 ± 0.5*	12.9 ± 1.3
	<i>μmol/L</i>			<i>μmol/kg</i>		
α-Tocopherol	16.2 ± 7.5*	38.3 ± 1.2	65.5 ± 9.1*	103 ± 13	36.2 ± 1.4	35.3 ± 1.9

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM, n = 6 or 7. Statistical comparison between the OOD and the FOD group was made with the Student's *t* test. \* *P* < 0.05, † *P* < 0.01, \*\* *P* < 0.001.

that in adipose tissue, the amount of AA was practically undetectable in both groups and the proportion of both myristic [14:0] and palmitoleic [16:1(n-7)] acids was higher in rats fed FOD than in rats fed OOD (Table 3). In fetal plasma, the proportions of the different fatty acids did not differ between the groups, except for palmitic acid [16:0], AA and linoleic acid. Palmitic acid was higher and both AA and linoleic acid [18:2(n-6)] were lower in fetuses of dams fed FOD rather than OOD; the difference was especially striking for AA, being barely detectable in plasma of fetuses of dams fed FOD (Table 3). In fetal liver, the proportions of stearic acid [18:0], EPA and DHA were higher, whereas the proportions of oleic acid and AA were lower in the former (Table 3). Similarities in the fatty acid profile between maternal plasma and fetal liver prompted us to calculate linear correlations with individual values, and we found that although the correlation was not significant when all saturated fatty acids were considered ( $r = 0.04$ ,  $n = 10$ ), it was significant when either monounsaturated fatty acids ( $r = 0.73$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ) or (n-6)- ( $r = 0.89$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ) or (n-3)- ( $r = 0.86$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ ) PUFA were considered.

The concentrations of α-tocopherol in both maternal and fetal plasma as well as in fetal liver and brain were significantly lower in the FOD group than in the OOD group (Table 4).

Pregnant rats fed both diets were allowed to deliver (expt. 2). Although no difference was found in litter size between groups ( $13.8 ± 1.2$  in FOD and  $12.5 ± 0.8$  in OOD), this variable was adjusted to eight pups per litter, and pups were allowed to suckle from their own dams. From the 1st d after birth, pups of rats fed FOD had lower body weights, with this difference especially striking from d 8 on (Fig. 1A). The length of the pups did not differ between groups up to age 10 d, but from then on, pups of dams fed FOD were shorter than those of dams fed OOD (Fig. 1B). Several tests related to body and psychomotor maturation were carried out in these pups, and results showed that either eye or auditive duct opening, as well as ARR or SRR acquisition, occurred earlier in the pups of dams fed OOD than in the pups of dams fed FOD (Fig. 2). These pups were killed at d 21 of suckling, and their plasma

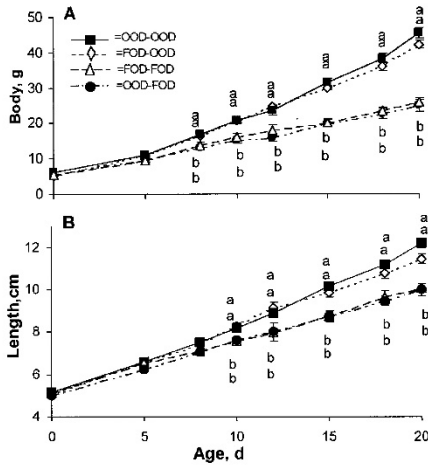
had higher palmitoleic acid concentrations, whereas both EPA and DHA were much higher in those suckling dams fed FOD rather than OOD. Oleic and linoleic acids and AA were lower in those suckling dams fed FOD rather than OOD (Table 5). Livers of pups suckling dams fed FOD had higher stearic acid, EPA and DHA and lower oleic and linoleic acid and AA than those suckling dams fed OOD (Table 5). In brain phospholipids, the proportion of AA was lower and the proportions of myristic acid, EPA and DHA were higher in pups suckling dams fed FOD compared with those suckling dams fed OOD (Table 5). The concentration of α-tocopherol was significantly lower in plasma and liver of pups suckling dams fed FOD than of pups of dams fed OOD, whereas α-tocopherol in brain did not differ between the two groups (Table 5).

To determine whether the differences between pups of dams fed FOD and those of dams fed OOD were a consequence of the intrauterine milieu or were affected by suckling, newborns from rats fed either FOD or OOD during pregnancy were cross-fostered (expt. 4). Both body weight and length were lower in suckling rat pups whose dams were fed OOD during pregnancy but that suckled dams fed FOD (OOD-FOD), to the concentration found in the FOD-FOD group, whereas both variables recovered in FOD-OOD pups to the concentration found in OOD-OOD pups (Fig. 3). Similar intergroup relationships were found in the body and psychomotor maturation indices studied, because both the eye and auditive duct opening and both the ARR and the SRR acquisition occurred later in the FOD-FOD and OOD-FOD pups than in either FOD-OOD or OOD-OOD pups, although for both ARR and SRR, the difference between OOD-FOD and FOD-OOD was not significant ( $P = 0.506$  and  $0.257$ ) (Fig. 4).

At d 21 of suckling, plasma, liver and brain phospholipid fatty acid profiles did not differ in pups suckling dams fed the same diet, independent of the diet fed during pregnancy, whereas they were substantially different between those suckling dams fed FOD compared with those fed OOD during lactation (Table 6). In plasma, EPA and DHA were lower and oleic acid and AA were higher in both FOD-OOD and OOD-OOD than in FOD-FOD or OOD-FOD pups. In liver, myristic

2860

AMUSQUIVAR ET AL.



**FIGURE 3** Body weight (A) and length (B) in newborn pups from rats fed fish oil diet (FOD) during pregnancy and lactation (FOD-FOD), FOD during pregnancy and olive oil diet (OOD) during lactation (FOD-OOD), OOD during pregnancy and FOD during lactation (OOD-FOD) or OOD during pregnancy and lactation (OOD-OOD) (expt. 4). Mean of all pups from each litter was used as experimental unit, and values are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  or 7 litters. Pairwise differences were analyzed by Tukey's test after ANOVA. Different letters indicate significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ) for pups of the same age.

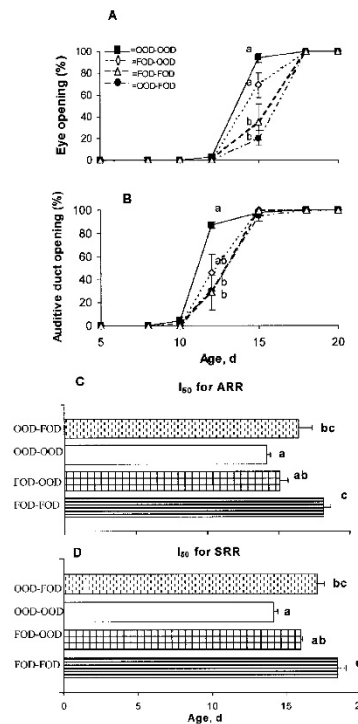
and oleic acids and AA were higher, whereas both EPA and DHA were lower in FOD-OOD and OOD-OOD than in FOD-FOD or OOD-FOD. In brain phospholipids, EPA and DHA were lower and linoleic acid and AA were higher in FOD-OOD and OOD-OOD than in either FOD-FOD or OOD-FOD (Table 6).  $\alpha$ -Tocopherol concentrations in both plasma and liver were much higher in pups from the FOD-OOD and OOD-OOD groups than in pups from the FOD-FOD and OOD-FOD groups, whereas in brain, no differences were found among the four groups (Table 6).

The differences detected in growth and fatty acid profile between the pups suckled by dams fed FOD and OOD prompted us to determine milk production and composition (expt. 3). The feeding of FOD during pregnancy and lactation decreased milk yield measured at d 7–8 and 15–16 after delivery compared with dams fed OOD (Table 7), although food intake did not differ between the two groups (data not shown). Although the concentration of total fatty acids in milk (mainly in the form of triglycerides) did not differ between the two groups (data not shown), the proportions of myristic acid, palmitic acid, stearic acid, palmitoleic acid, DHA and EPA were higher and the proportions of oleic acid and AA were lower in milk from rats fed FOD than in milk from those fed OOD (Table 7). The concentration of  $\alpha$ -tocopherol in milk from FOD-fed rats was much lower than that from OOD-fed rats (Table 7).

A negative effect of the deficient concentration of either AA or  $\alpha$ -tocopherol in pups of lactating dams fed FOD may have contributed to their decreased growth and body and psychomotor maturation. To determine which of these two components was responsible for the effects, during lactation the FOD was supplemented with either  $\gamma$ -linolenic acid [18:3(n-6)] as substrate for endogenous AA synthesis (FOD- $\gamma$ L),

AA (FOD-AA) or vitamin E (FOD-VE) (expt. 5). Substantial amounts of  $\gamma$ -linolenic acid were present in FOD- $\gamma$ L and of AA in FOD-AA, both of which were practically absent in the other diets (Table 2). A similar concentration of vitamin E was present in all diets, except for the FOD-VE, in which the vitamin E concentration was  $>10$  times higher than that in any other diet (Table 2). Compared with pups suckling dams fed OOD, both body weight and length were significantly lower in FOD or FOD-VE pups, whereas no difference was found between those of OOD and FOD- $\gamma$ L pups, and the pups of dams fed FOD-AA had a lower body weight than those of dams fed OOD, although length did not differ (Table 8). The date of acquisition of either ARR or SRR was also delayed in pups of dams fed FOD, FOD-AA or FOD-VE compared with those from dams fed OOD, whereas no differences were found between pups of dams fed OOD or FOD- $\gamma$ L diets (Table 8).

Except for lower oleic acid in plasma and liver of pups of dams fed FOD with any supplement compared with those of



**FIGURE 4** Acquisition of eyelid (A) and ear opening (B) expressed as the percent of pups per litter attaining mature response, and air righting (ARR) (C) and surface righting (SRR) reflexes (D) expressed as the day that 50% of the litter acquired the mature response ( $I_{50}$ ) in newborn pups from rats fed fish oil diet (FOD) during pregnancy and lactation (FOD-FOD), FOD during pregnancy and olive oil diet (OOD) during lactation (FOD-OOD), OOD during pregnancy and FOD during lactation (OOD-FOD) or OOD during pregnancy and lactation (OOD-OOD) (expt. 4). Mean of all pups from each litter was used as experimental unit, and values are means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  or 7 litters. Pairwise differences were analyzed by Tukey's test after ANOVA. Different letters indicate significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ).

## DIETARY FISH/OILIVE OILS IN PREGNANCY/LACTATION

2861

TABLE 6

Fatty acid profile and  $\alpha$ -tocopherol concentration in plasma, liver and brain of 21-d-old rats suckling dams fed either the fish oil diet (FOD) or the olive oil diet (OOD) during pregnancy and cross-fostered during lactation<sup>1,2</sup>

	FOD-FOD	FOD-OOD	OOD-OOD	OOD-FOD
Plasma fatty acids				
	<i>g/100 g fatty acids</i>			
12:0	0.98 ± 0.18	0.92 ± 0.31	1.47 ± 0.21	0.65 ± 0.24
14:0	2.78 ± 0.17	1.91 ± 0.38	2.76 ± 0.30	2.48 ± 0.40
16:0	23.3 ± 1.1a	19.5 ± 1.1ab	18.1 ± 0.3b	22.1 ± 0.7a
18:0	9.87 ± 0.38	10.2 ± 0.4	10.2 ± 0.4	9.77 ± 0.36
16:1(n-7)	2.75 ± 0.21a	1.88 ± 0.42ab	1.43 ± 0.18b	2.95 ± 0.27a
18:1(n-9)	15.3 ± 0.7b	39.8 ± 3.4a	41.3 ± 1.2a	14.7 ± 1.1b
18:2(n-6)	6.22 ± 0.23b	9.55 ± 0.30a	9.85 ± 0.18a	7.49 ± 0.37b
20:4(n-6)	5.27 ± 0.15b	11.1 ± 1.0a	12.8 ± 0.6a	5.95 ± 0.38b
20:5(n-3)	18.5 ± 0.7a	1.48 ± 1.48b	0.01 ± 0.01b	19.1 ± 0.3a
22:6(n-3)	13.4 ± 0.7a	3.01 ± 1.59b	1.47 ± 0.31b	13.9 ± 0.4a
Plasma $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/L	29.1 ± 7.6b	59.2 ± 2.0a	60.3 ± 1.8a	23.4 ± 1.9b
Liver fatty acids				
	<i>g/100 g fatty acids</i>			
12:0	0.23 ± 0.05ab	0.40 ± 0.04a	0.28 ± 0.07ab	0.23 ± 0.03b
14:0	1.05 ± 0.19b	2.34 ± 0.10a	1.93 ± 0.20a	1.16 ± 0.09b
16:0	22.1 ± 0.9a	19.7 ± 0.4ab	17.5 ± 1.2b	20.2 ± 1.1ab
18:0	13.2 ± 0.5a	10.3 ± 0.3bc	9.50 ± 0.70c	11.9 ± 0.6ab
16:1(n-7)	1.48 ± 0.17	2.01 ± 0.16	1.51 ± 0.43	1.50 ± 0.11
18:1(n-9)	12.5 ± 0.8c	44.0 ± 0.7a	37.7 ± 2.2b	12.8 ± 0.3c
18:2(n-6)	3.31 ± 0.68	4.77 ± 0.14	4.66 ± 0.27	3.90 ± 0.37
20:4(n-6)	4.24 ± 0.32b	8.66 ± 0.28a	8.06 ± 0.79a	3.76 ± 0.37b
20:5(n-3)	6.03 ± 0.59a	0.07 ± 0.03b	0.08 ± 0.03b	5.45 ± 0.54a
22:6(n-3)	26.2 ± 1.1a	2.95 ± 0.11b	2.83 ± 0.30b	23.5 ± 1.9a
Liver $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/kg	142 ± 13b	560 ± 48a	558 ± 41a	121 ± 14b
Brain phospholipid fatty acids				
	<i>g/100 g fatty acids</i>			
12:0	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.14	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
14:0	0.90 ± 0.14	0.22 ± 0.14	0.42 ± 0.28	0.30 ± 0.18
16:0	30.6 ± 2.5a	25.9 ± 1.1ab	22.9 ± 1.3b	30.8 ± 2.3a
18:0	18.7 ± 2.3c	30.8 ± 1.4a	27.6 ± 1.2b	23.4 ± 1.7bc
16:1(n-7)	1.10 ± 0.58a	0.01 ± 0.01b	0.01 ± 0.01b	0.13 ± 0.12ab
18:1(n-9)	15.6 ± 4.0ab	15.4 ± 1.4ab	17.8 ± 2.2a	9.65 ± 1.27b
18:2(n-6)	5.38 ± 0.67b	8.36 ± 0.52a	8.69 ± 0.72a	4.81 ± 0.86b
20:4(n-6)	2.73 ± 0.47b	5.32 ± 0.64a	6.97 ± 0.59a	1.46 ± 0.45b
20:5(n-3)	6.41 ± 1.43ab	4.62 ± 0.76b	1.68 ± 0.61b	9.89 ± 1.95a
22:6(n-3)	9.53 ± 3.16a	1.83 ± 0.42c	2.33 ± 0.26bc	8.82 ± 2.37ab
Brain $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/kg	41.1 ± 0.9	38.1 ± 0.9	36.5 ± 0.2	35.8 ± 2.3

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM,  $n = 6$  or  $7$ .

<sup>2</sup> Tukey's test was used to determine differences between groups after one-way ANOVA. Different superscripts in a row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). No superscript letters in a row indicate no significant differences.

dams fed OOD and a similar content of monounsaturated fatty acids in brain phospholipids in pups from all the groups, major differences in fatty acid profile included significantly lower AA in plasma and liver fatty acids and in brain phospholipids in pups of dams fed either FOD or FOD-VE and more AA in plasma and liver fatty acids in pups of dams fed FOD-AA compared with pups of dams fed OOD (Table 9). Compared with pups of dams fed OOD,  $\alpha$ -tocopherol concentration in plasma and liver was greater in pups of dams fed FOD-VE than in any of the other groups, whereas values in pups of dams fed OOD were higher than those of pups of dams fed FOD, FOD- $\gamma$ L or FOD-AA (Table 9). However, brain  $\alpha$ -tocopherol did not differ among the groups (Table 9).

## DISCUSSION

The present study shows that a deficiency of AA and  $\alpha$ -tocopherol occurs in both in dams and fetuses when rats are fed a diet with a moderate amount of fish oil (10%) as the only nonvitamin fat component in comparison with those fed the same diet but containing olive oil instead of fish oil during pregnancy, and a similar effect is found 21 d after delivery in pups when the dietary treatment is maintained during lactation. In fact, when pups from rats fed FOD were studied during suckling, a decreased growth rate and a delay in the acquisition of body and psychomotor maturation indices were found with the AA and  $\alpha$ -tocopherol deficiencies. The effect was also

2862

AMUSQUIVAR ET AL.

TABLE 7

Milk yield at d 7/8 and 15/16 and composition at d 10 after delivery in rats fed either fish oil diet (FOD) or olive oil diet (OOD) during lactation<sup>1</sup>

	FOD	OOD
<i>mL · pup<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup></i>		
Milk yield		
d 7/8 of lactation	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1*
d 15/16 of lactation	2.8 ± 0.3	4.1 ± 0.1*
<i>g/100 g fatty acids</i>		
Fatty acids		
12:0	5.55 ± 1.15	4.39 ± 0.54
14:0	8.18 ± 1.30	5.19 ± 0.55†
16:0	25.2 ± 0.5	19.0 ± 0.3*
18:0	4.44 ± 0.19	3.76 ± 0.05*
16:1(n-7)	6.65 ± 0.30	2.21 ± 0.11*
18:1(n-9)	31.3 ± 1.7	59.2 ± 1.0*
18:2(n-6)	3.79 ± 0.53	3.99 ± 0.09
20:4(n-6)	0.38 ± 0.07	0.93 ± 0.06*
20:5(n-3)	2.95 ± 0.49	0.01 ± 0.01*
22:6(n-3)	7.94 ± 0.37	0.15 ± 0.02*
α-Tocopherol, mmol/L	13.7 ± 1.9	49.9 ± 7.4*

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM, *n* = 13 or 14. Statistical comparison was made with the Student's *t* test. \* *P* < 0.001, † *P* < 0.05.

found when newborns of rats fed OOD during pregnancy were cross-fostered to rats fed FOD.

The fatty acid profile in adipose tissue in rats fed either diet during pregnancy was very similar to the composition of the diet, including a lack of AA in rats from either group and an enhanced proportion of DHA and EPA at the expense of oleic acid in adipose tissue of rats fed FOD. Most of the fat accumulated in adipose tissue comes from the diet due to its low capacity to synthesize fatty acids (Shargo et al. 1969), and although lipogenesis is enhanced in this tissue during pregnancy (Palacín et al. 1991), maternal hyperphagia and unchanged or even enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity during early gestation (Knopp et al. 1975) allow dietary fatty acids circulating in plasma in the form of triglyceride-rich lipoproteins (chylomicrons and VLDL) to be taken up by the tissue. Different from adipose tissue, a substantial amount of AA appeared in both liver and plasma of rats fed OOD, probably as result of its active synthesis from linoleic acid [18:2(n-6)] in liver. This was, however, not the case in rats fed FOD, in which the enhanced content of both DHA

and EPA could have caused the competitive inhibition of Δ6-desaturase (Christiansen et al. 1991, Raz et al. 1997 and 1998), the rate-limiting reaction for the conversion of linoleic acid to γ-linolenic acid in the synthesis of AA. Our finding that supplementation with γ-linolenic acid in lactating rats fed FOD overcame the deficiency of AA in their suckling newborns further supports this hypothesis.

Except for saturated fatty acids, which show a higher proportion in fetal compared with maternal structures, probably as result of the well-recognized lipogenic capability of fetal liver (Lorenzo et al. 1981), similar changes in the fatty acid profile were detected in both fetal plasma and liver, as well as in maternal sites. Preferential uptake of both monounsaturated and PUFA by the placenta and their consequent transfer to the fetus seem to be mediated via the placental plasma membrane fatty acid-binding protein (p-FABP<sub>pm</sub>), as recently reviewed (Dutta-Roy 2000), and although the process has different preferences depending on the type of fatty acid, the present findings show that the correlation is significant for monounsaturated and for either (n-6) or (n-3) PUFA. Although precursor PUFA may be elongated and desaturated in the rat fetus and no exogenous supply of 20:4(n-6) or 22:6(n-3) should be required if the precursor lipids, 18:2(n-6) and 18:3(n-3), respectively, are adequate in the diet (Hachey 1994), the present findings show that an excess of (n-3) fatty acids in maternal diet causes a specific deficiency of AA in the fetus, with the effect being a consequence of either the inhibitory action of (n-3) fatty acids on Δ6 desaturation within the fetus or an altered proportional fatty acid placental transfer secondary to the changes taking place in the maternal site or both.

The present findings also show that a proportional excess of dietary PUFA enhances the depletion of α-tocopherol, causing a deficient condition of this antioxidant in both the dam and the fetus. The feeding of fish oil enhances vitamin E requirements (Cho and Choi 1994), probably as a consequence of the effect of PUFA enrichment on enhancement of lipid peroxidation (Mazière et al. 1998). This condition contrasts with the decreased susceptibility to lipid peroxidation that occurs when rats are fed diets supplemented with olive oil (Öztezcan et al. 1996), allowing appropriate endogenous concentrations of α-tocopherol, as seen in the present study in both pregnant rats and fetuses. Despite the decreased AA and α-tocopherol concentrations in fetuses of pregnant rats fed FOD, litter size and fetal weight were unaffected, and a similar finding was reported by others who subjected rats during pregnancy to different dietary fat compositions (Buisson et al. 1997) or even under conditions of decreased α-tocopherol concentration (Schinella et al. 1999). These findings support the notion that during pregnancy in rats, neither substantial

TABLE 8

Effect on pups of supplementation with γ-linolenic acid (γL), arachidonic acid (AA) or vitamin E (VE) to the diet of lactating rats fed fish oil diet (FOD) compared with those fed olive oil diet (OOD)<sup>1</sup>

	OOD	FOD	FOD-γL	FOD-AA	FOD-VE
d 21 body weight, g	42.2 ± 2.7 <sup>a</sup>	26.3 ± 4.0 <sup>b</sup>	32.0 ± 2.3 <sup>ab</sup>	24.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	22.0 ± 1.9 <sup>b</sup>
d 21 body length, cm	11.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	9.7 ± 0.5 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>	9.92 ± 0.21 <sup>ab</sup>	9.39 ± 0.30 <sup>b</sup>
I <sub>50</sub> for ARR <sup>2</sup>	11.9 ± 0.6 <sup>c</sup>	16.5 ± 0.5 <sup>ab</sup>	13.4 ± 0.6 <sup>c</sup>	14.3 ± 0.5 <sup>bc</sup>	17.6 ± 0.8 <sup>a</sup>
I <sub>50</sub> for SRR	15.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	18.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	15.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	16.9 ± 0.5 <sup>ab</sup>	19.1 ± 0.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are expressed as means ± SEM, *n* = 4–6. Tukey's test was used to determine differences between groups after one-way ANOVA. Different superscript letters in a row indicate significant differences (*P* < 0.05).

<sup>2</sup> I<sub>50</sub>, day that 50% of the litter acquired the mature response; ARR, air righting reflex; SRR, surface righting reflex.

DIETARY FISH/OILIVE OILS IN PREGNANCY/LACTATION

2863

TABLE 9

Fatty acid profile and vitamin E concentration in plasma, liver and brain of 21-d-old rats suckling dams fed fish oil diet (FOD) or FOD supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid (FOD- $\gamma$ L), arachidonic acid (FOD-AA) or vitamin E (FOD-VE) compared with those fed olive oil diet (OOD)<sup>1</sup>

	OOD	FOD	FOD- $\gamma$ L	FOD-AA	FOD-VE
<i>g/100 g fatty acids</i>					
Plasma fatty acids					
12:0	1.66 $\pm$ 0.33ab	2.22 $\pm$ 0.27a	1.19 $\pm$ 0.35ab	1.23 $\pm$ 0.15ab	1.10 $\pm$ 0.13b
14:0	2.51 $\pm$ 0.33ab	3.75 $\pm$ 0.60a	2.36 $\pm$ 0.27ab	2.13 $\pm$ 0.21b	2.37 $\pm$ 0.19ab
16:0	20.1 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	25.7 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	19.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	20.6 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>
18:0	10.1 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 0.8	9.74 $\pm$ 0.73	11.6 $\pm$ 0.6	9.11 $\pm$ 0.33
16:1(n-7)	1.73 $\pm$ 0.25	2.18 $\pm$ 0.24	1.78 $\pm$ 0.15	1.68 $\pm$ 0.08	2.28 $\pm$ 0.14
18:1(n-9)	34.4 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	16.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	14.6 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	13.7 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	19.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
18:2(n-6)	10.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	6.09 $\pm$ 0.59 <sup>bc</sup>	8.06 $\pm$ 0.73 <sup>ab</sup>	3.86 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>	7.11 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>
18:3(n-6)	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
20:4(n-6)	13.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	3.89 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	16.4 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	30.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	5.01 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>
20:5(n-3)	1.37 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	14.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	8.17 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	4.38 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	14.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
22:6(n-3)	1.80 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	9.69 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	13.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
Plasma $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/L	41.1 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	24.3 $\pm$ 2.5 <sup>c</sup>	18.0 $\pm$ 2.7 <sup>c</sup>	20.8 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>	57.4 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>
<i>g/100 g fatty acids</i>					
Liver fatty acids					
12:0	0.36 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.06
14:0	1.84 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	1.17 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>
16:0	20.6 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 0.4	22.1 $\pm$ 1.0	21.7 $\pm$ 1.0	23.5 $\pm$ 2.0
18:0	12.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	15.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	14.5 $\pm$ 0.9 <sup>ab</sup>	16.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	13.7 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
16:1(n-7)	1.54 $\pm$ 0.24	1.17 $\pm$ 0.17	1.45 $\pm$ 0.47	1.39 $\pm$ 0.22	2.09 $\pm$ 0.35
18:1(n-9)	38.8 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	13.8 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	16.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
18:2(n-6)	6.17 $\pm$ 0.24	3.54 $\pm$ 0.36	5.22 $\pm$ 0.44	3.56 $\pm$ 0.23	4.70 $\pm$ 0.33
18:3(n-6)	0.21 $\pm$ 0.08	0.01 $\pm$ 0.01	0.93 $\pm$ 0.53	0.58 $\pm$ 0.43	0.03 $\pm$ 0.02
20:4(n-6)	12.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	4.69 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	9.19 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	18.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	4.71 $\pm$ 0.61 <sup>c</sup>
20:5(n-3)	0.32 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	6.36 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	4.53 $\pm$ 0.69 <sup>bc</sup>	2.43 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>	7.90 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>
22:6(n-3)	3.59 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>	32.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	22.5 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	20.3 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	23.2 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>
Liver $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/kg	300 $\pm$ 36 <sup>b</sup>	139 $\pm$ 19 <sup>c</sup>	128 $\pm$ 12 <sup>c</sup>	139 $\pm$ 12 <sup>c</sup>	477 $\pm$ 37 <sup>a</sup>
<i>g/100 g fatty acids</i>					
Brain phospholipid fatty acids					
12:0	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
14:0	0.41 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.04
16:0	24.8 $\pm$ 2.2	24.4 $\pm$ 1.6	24.9 $\pm$ 1.0	24.4 $\pm$ 1.3	24.9 $\pm$ 1.4
18:0	22.9 $\pm$ 0.7	22.8 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 0.3
16:1(n-7)	0.91 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.05	0.92 $\pm$ 0.07	1.19 $\pm$ 0.07
18:1(n-9)	17.7 $\pm$ 2.5	18.0 $\pm$ 2.1	15.8 $\pm$ 1.2	14.9 $\pm$ 1.6	16.2 $\pm$ 0.3
18:2(n-6)	0.77 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.16 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.73 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
18:3(n-6)	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.01
20:4(n-6)	12.0 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	6.03 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	7.09 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>
20:5(n-3)	1.74 $\pm$ 0.52	3.48 $\pm$ 0.54	2.14 $\pm$ 0.46	2.88 $\pm$ 0.30	2.71 $\pm$ 0.53
22:6(n-3)	11.4 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	18.2 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	16.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	14.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	20.9 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
Brain $\alpha$ -tocopherol, $\mu$ mol/kg	37.4 $\pm$ 1.9	36.2 $\pm$ 1.9	30.9 $\pm$ 2.0	28.6 $\pm$ 1.3	36.0 $\pm$ 2.6

<sup>1</sup> Values are expressed as means  $\pm$  SEM,  $n = 4-6$ . Tukey's test was used to determine differences between groups after ANOVA. Different superscript letters in a row indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). No superscript letters in a row indicate that differences are not significant,  $P \geq 0.05$ .

changes in dietary fatty acids nor an antioxidant-deficient condition affects pregnancy outcome, probably because in this species a substantial part of the development of neural tissue occurs postnatally (Dobbing and Sands 1979), as is also the case in humans (Pomeroy and Segal 1998). This view is supported in the present study by the findings in the cross-fostering experiments, in which pups born to dams fed FOD during pregnancy showed a postnatal growth rate and psychomotor maturation indices similar to those of pups of dams fed OOD when allowed to suckle from dams fed OOD.

An important delay in growth rate and psychomotor development was seen in pups suckling dams fed FOD during

lactation. The effect could be the result of either the decreased milk yield or the altered fatty acid composition in milk detected in these rats, with the latter reflecting their plasma fatty acids profile, or both. A decreased availability of milk during suckling, such as that caused by maternal underfeeding in pair-fed nutritional controls of lactating rats fed alcohol, decreases pup growth rate (Tavares do Carmo et al. 1999), but sensory maturation indices seem to be less affected (Lopez Tejero et al. 1986). The feeding of FOD during lactation also caused a depletion of  $\alpha$ -tocopherol in plasma and liver and a major alteration in neural fatty acid composition, with a specific decline in AA in brain phospholipids. Both of these

changes, the  $\alpha$ -tocopherol deficiency and the decline in AA in brain phospholipids, could have affected neurodevelopment in the pups, because similar results were reported for pups of dams fed a fish oil-supplemented diet throughout pregnancy and lactation (Saste et al. 1998). In adult rats fed a fish oil-supplemented diet, monoaminergic neurotransmission and behavior were affected (Chalon et al. 1998), and in adults subjected to a vitamin E deficiency regimen, a disturbance of monoamine metabolism in brain was observed (Adachi et al. 1999). In an attempt to determine which of these two effects (decreased AA in brain phospholipids or  $\alpha$ -tocopherol deficiency) was responsible for the delayed growth rate and neurodevelopment in pups of dams fed FOD, a dietary supplement experiment was carried out. In this experiment, conditions that restored brain AA content rather than plasma and liver concentrations of  $\alpha$ -tocopherol avoided the negative effects of the feeding of FOD during lactation. The effect was more evident when  $\gamma$ -linolenic acid rather than AA was supplemented to FOD, although both treatments restored brain phospholipid AA content to the same concentration as in pups whose dams were fed OOD. The only difference was the absence of linoleic acid [18:2(n-6)] in brain phospholipids when rats were supplemented with AA, whereas it was present in those supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid at a concentration that did not differ from that of those whose dams were fed OOD. Regarding the different response to supplementation with  $\gamma$ -linolenic acid versus with AA, although it was previously found in humans that diets rich in AA decrease the proportion of linoleic acid in plasma phospholipids (Sinclair and Mann 1996), the effect is likely a consequence of the replacement by AA of linoleic acid in tissues (Whelan 1996). It is, however, worth emphasizing the exquisite capability of the brain to buffer exaggerated increments in plasma concentrations of AA, as shown in pups of dams fed FOD supplemented with AA, which had much higher plasma concentrations than any of the other groups, whereas the proportional content in brain phospholipids did not differ from those of dams fed either OOD or FOD supplemented with  $\gamma$ -linolenic acid.

The supplementation of vitamin E to lactating rats fed FOD enhanced plasma and liver  $\alpha$ -tocopherol concentrations in pups but did not modify the concentration in brain compared with pups of dams fed OOD. It has previously been shown in humans that even high oral  $\alpha$ -tocopherol supplementation did not increase ventricular cerebrospinal fluid  $\alpha$ -tocopherol concentrations (Pappert et al. 1996), and in rats,  $\alpha$ -tocopherol intake modestly increases brain  $\alpha$ -tocopherol (Martin et al. 1999, Vatassery et al. 1988), with the change being much smaller than that in plasma and other tissues, including the liver. In fact, the turnover or exchange half-life rate of  $\alpha$ -tocopherol in the nervous system is much slower than that in plasma (Vatassery 1992), and the brain uptake index of  $\alpha$ -tocopherol in mice is very low (Adams and Wang 1994). Furthermore, the high content of PUFA and, more specifically, DHA in brain phospholipids in pups suckling dams fed FOD supplemented with vitamin E may have enhanced the consumption of antioxidants and thus may impeded the increase in brain  $\alpha$ -tocopherol concentration over the values for pups of dams fed OOD. Because vitamin E deficiency plays a role in the disturbance of monoamine metabolism in rat brain (Adachi et al. 1999), there is no way to determine whether this condition aggravates the nervous system function caused by the altered fatty acid profile of these animals. However, the fact that supplementation of  $\gamma$ -linolenic acid to the lactating rats fed FOD increased the AA content of brain phospholipids in their pups and normalized body weight and psychomotor

maturation variables despite their low  $\alpha$ -tocopherol concentrations supports a more important role of the appropriate availability of AA rather than vitamin E on postnatal development.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Milagros Morante for her excellent technical assistance and Beatriz Ramos for editorial assistance.

#### LITERATURE CITED

- Adachi, K., Izumi, M. & Mitsuura, T. (1999) Effect of vitamin E deficiency on rat brain monoamine metabolism. *Neurochem. Res.* 24: 1307-1311.
- Adams, J. D. & Wang, B. (1994) Vitamin E uptake into the brain and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 362-363.
- Arbuckle, L. & Innis, S. (1992) Docosahexaenoic acid in developing brain and retina of piglets fed high or low alpha-linolenate formula and without fish oil. *Lipids* 27: 89-93.
- Barbas, C., Castro, M., Bonet, B., Viana, M. & Herrera, E. (1997) Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 778: 415-420.
- Barbas, C. & Herrera, E. (1998) Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk. *J. Physiol. Biochem.* 54: 167-174.
- Berry, E. M., Eisenberg, S., Haratz, D., Friedlander, Y., Norman, Y., Kaufman, N. A. & Stein, Y. (1991) Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins: The Jerusalem Nutrition Study: High MUFAs vs high PUFAs. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 899-907.
- Bourre, J.-M.E., Dumont, O. L., Clément, M. E. & Durand, G. A. (1997) Endogenous synthesis cannot compensate for absence of dietary oleic acid in rats. *J. Nutr.* 127: 488-493.
- Bourre, J. M., Bonnell, M., Dumont, O., Nalbone, G. & Lafont, H. (1988) High dietary fish oil alters the brain polyunsaturated fatty acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 960: 458-461.
- Bourre, J. M., Bonnell, M., Dumont, O., Piciotti, M., Calaf, R., Portugal, H., Nalbone, G. & Lafont, H. (1990) Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1043: 149-152.
- Buson, A., Lu, H. Q., Guo, F. & Jen, K.L.C. (1997) High-fat feeding of different fats during pregnancy and lactation in rats: Effects on maternal metabolism, pregnancy outcome, milk and tissue fatty acid profiles. *Nutr. Res.* 17: 1541-1554.
- Carlson, S. E., Carver, J. D. & House, S. G. (1986) High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linoleic acid: A comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids. *J. Nutr.* 116: 718-725.
- Carlson, S. E., Cook, R. J., Werkman, S. H. & Tolley, E. A. (1992) First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids* 27: 901-907.
- Carlson, S. E. & Werkman, S.H.P.J.M. (1993) Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1073-1077.
- Chalon, S., Delion-Vancassel, S., Belzung, C., Guilloteau, D., Leguisquet, A. M., Besnard, J. C. & Durand, G. (1998) Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *J. Nutr.* 128: 2512-2519.
- Cho, S.-H. & Choi, Y. (1994) Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29: 47-52.
- Christiansen, E. N., Lund, J. S., Rortveit, T. & Rustan, A. C. (1991) Effect of dietary n-3 and n-6 fatty acids on fatty acid desaturation in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1082: 57-62.
- Ciandinin, M. T., Chappell, J. E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P. R. & Chance, G. W. (1980) Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum. Dev.* 4: 121-129.
- Connor, W. E., Lowensohn, R. & Hatcher, L. (1996) Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* 31: S183-S187.
- Dobbing, J. & Sands, J. (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3: 79-84.
- Dutta-Roy, A. K. (2000) Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 315S-322S.
- Fleisler, S. & Anderson, R. E. (1983) Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22: 79-131.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 22: 24-36.
- Girón, M. D., Mataix, F. J., Faus, M. J. & Suárez, M. D. (1989) Effect of long-term feeding of olive and sunflower oils on fatty acid composition and desaturation activities of liver microsomes. *Biochem. Int.* 19: 645-656.
- Hachey, D. L. (1994) Benefits and risks of modifying maternal fat intake in pregnancy and lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(suppl): 454S-464S.
- Harnosh, M. (1998) Long-chain polyunsaturated fatty acids: who needs them. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 96-103.



## DIETARY FISH/Olive OILS IN PREGNANCY/LACTATION

2865

- Jumpsen, J. & Clandinin, M. T. (1995) Lipids and essential fatty acids in brain development. In: *Brain Development: Relationship to Dietary Lipid and Lipid Metabolism*, pp. 20–36. AOCS Press, Champaign, IL.
- Knopp, R. H., Boroush, M. A. & O'Sullivan, J. B. (1975) Lipid metabolism in pregnancy. II. Postheparin lipolytic activity and hypertriglyceridemia in the pregnant rat. *Metabolism* 24: 481–493.
- Lepage, G. & Roy, C. C. (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 25: 1391–1396.
- Lepage, G. & Roy, C. C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27: 114–120.
- Lopez Tejero, D., Ferrer, I., Llobera, M. & Herrera, E. (1986) Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth, sensory reflex maturation and brain development in the rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12: 251–260.
- Lorenzo, M., Caldes, T., Benito, M. & Medina, J. M. (1981) Lipogenesis in vivo in maternal and foetal tissues during late gestation in the rat. *Biochem. J.* 198: 425–428.
- Martin, A., Janigian, D., Shukitt-Hale, B., Prior, R. L. & Joseph, J. A. (1999) Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: Implications for health recommendations. *Brain Res.* 845: 50–59.
- Mazière, C., Dantin, F., Conte, M. A., Degonville, J., Ali, D., Dubois, F. & Mazière, J. C. (1998) Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem. J.* 336: 57–62.
- Navarro, M. D., Perriago, J. L., Pita, M. L. & Hortelano, P. (1994) The n-3 polyunsaturated fatty acid levels in rat tissue lipids increase in response to dietary olive oil relative to sunflower oil. *Lipids* 29: 845–849.
- Öztecan, S., Toker, G. & Uysal, M. (1996) The susceptibility of plasma to lipid peroxidation in rats fed on diets supplemented with olive oil and sunflower seed oil. *Biochem. Arch.* 12: 13–18.
- Palacin, M., Lasunción, M. A., Asunción, M. & Herrera, E. (1991) Circulating metabolite utilization by peruterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* 40: 534–539.
- Pappert, E. J., Tangney, C. C., Goetz, C. G., Ling, Z. D., Lipton, J. W., Stebbins, G. T. & Carvey, P. M. (1996) Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: Dose-response study and correlations with plasma levels. *Neurology* 47: 1037–1042.
- Periago, J. L., Suarez, M. D. & Pita, M. L. (1990) Effect of dietary olive oil, corn oil and medium-chain triglycerides on the lipid composition of rat red blood cell membranes. *J. Nutr.* 120: 986–994.
- Pomeroy, S. L. & Segal, R. A. (1998) Development of the nervous system. In: *Fetal and Neonatal Physiology* (Polin, R. A. & Fox, W. W., eds.), pp. 2083–2103. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Quaresima, V., Pizzi, A., De Blasi, R. A., Ferrari, A. & Ferrari, M. (1996) Influence of the treadmill speed/slope on quadriceps oxygenation during dynamic exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 388: 231–235.
- Rao, C. V., Zang, E. & Reddy, B. (1993) Effect of high fat corn oil, olive oil and fish oil on phospholipid fatty acid composition in male F344 rats. *Lipids* 28: 441–447.
- Raz, A., Kamin-Belsky, N., Przeddecki, F. & Obukowicz, M. (1998) Dietary fish oil inhibits delta6-desaturase activity *in vivo*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 241–245.
- Raz, A., Kamin-Belsky, N., Przeddecki, F. & Obukowicz, M. G. (1997) Fish oil inhibits delta 6 desaturase activity *in vivo*: Utility in a dietary paradigm to obtain mice depleted of arachidonic acid. *J. Nutr. Biochem.* 8: 558–565.
- Ruiz, J. I. & Ochoa, B. (1997) Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J. Lipid Res.* 38: 1482–1489.
- Rupérez, F. J., Barbas, C., Castro, M. & Herrera, E. (1999) Determination of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate in diets of experimental animals: Study of stability in the diets. *J. Chromatogr. A.* 839: 93–99.
- Ruyle, M., Connor, W. E., Anderson, G. J. & Lowensohn, R. I. (1990) Placental transfer of essential fatty acids in humans: Venous-arterial differences for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 7902–7906.
- Sampson, D. A. & Jansen, G. R. (1984) Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight and weight gain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3: 613–617.
- Saste, M. D., Carver, J. D., Stockard, J. E., Benford, V. J., Chen, L. T. & Phelps, C. P. (1998) Maternal diet fatty acid composition affects neurodevelopment in rat pups. *J. Nutr.* 128: 740–743.
- Scaccini, C., Nardini, M., D'Aquino, M., Gentili, V., Di Felice, M. & Tomassi, G. (1992) Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.* 33: 627–633.
- Schinella, G. R., Marin, M. C., De Alaniz, M. J. T., De Buschiazio, P. M. & Tournier, H. A. (1999) Antioxidant defence system and lipid peroxidation in lactating rats: Effect of dietary vitamin E during gestation and lactation. *Nutr. Res.* 19: 795–803.
- Shargo, E., Spennetta, T. & Gordon, E. (1969) Fatty acid synthesis in human adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 244: 2761–2766.
- Simán, C. M. & Eriksson, U. J. (1997) Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46: 1054–1061.
- Sinclair, A. J. & Mann, N. J. (1996) Short-term diets rich in arachidonic acid influence plasma phospholipid polyunsaturated fatty acid levels and prostacyclin and thromboxane production in humans. *J. Nutr.* 126: 1110S–1114S.
- Suzuki, H., Park, S. J., Tamura, M. & Ando, S. (1998) Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: A comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech. Ageing Dev.* 101: 119–128.
- Tavares do Carmo, M. G., Oller do Nascimento, C. M., Martin, A. & Herrera, E. (1999) Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. *Alcohol* 18: 71–76.
- Van Houwelingen, A. C., Sorensen, J. D., Hornstra, G., Simonis, M.M.G., Boris, J., Olsen, S. F. & Secher, N. J. (1995) Essential fatty acid status in neonates after fish-oil supplementation during late pregnancy. *Br. J. Nutr.* 74: 723–731.
- Vatassery, G. T. (1992) Vitamin E: Neurochemistry and implications for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 669: 97–109.
- Vatassery, G. T., Brin, M. F., Fahn, S., Kayden, H. J. & Traber, M. G. (1988) Effect of high doses of dietary vitamin E on the concentration of vitamin E in several brain regions, plasma, liver and adipose tissue of rats. *J. Neurochem.* 51: 621–623.
- Viana, M., Herrera, E. & Bonet, B. (1998) Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat: Prevention by vitamin E. *Diabetologia* 39: 1041–1046.
- Whelan, J. (1996) Antagonistic effects of dietary arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 126(suppl.): 1086S–1091S.
- Yonekubo, A., Honda, S., Okano, M., Takahashi, K. & Yamamoto, Y. (1993) Dietary fish oil alters rat milk composition and liver and brain fatty acid composition of fetal and neonatal rats. *J. Nutr.* 123: 1703–1708.
- Yonekubo, A., Honda, S., Okano, M., Takahashi, K. & Yamamoto, Y. (1994) Effects of dietary fish oil during the fetal and postnatal periods on the learning ability of postnatal rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 799–801.
- Zurier, R. B. (1993) Fatty acids, inflammation and immune responses. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 48: 57–62.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 935 (2001) 45–69

---



---

**JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A**


---



---

www.elsevier.com/locate/chroma

## Review

## Chromatographic analysis of $\alpha$ -tocopherol and related compounds in various matrices

F.J. Rupérez, D. Martín, E. Herrera, C. Barbas\*

*Facultad de CC Experimentales y Técnicas, Universidad S. Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe Ctra. Boadilla del Monte km 5,3,  
28668 Madrid, Spain*

**Abstract**

Tocopherols and tocotrienols (Vitamin E) are part of a group of “minor components” of main interest, present in the unsaponifiable fraction of many samples. Their importance in biological, metabolic and nutritional studies makes determination of tocopherols and related compounds of major interest. Present work critically reviews the different ways to perform sample pre-treatment and analysis of these compounds, related to the matrices, other analytes to be measured, sensitivity, and simplicity. The review includes well referenced tables that provide in-depth summaries of methodology for the chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related compounds in foods, pharmaceuticals, plants, animal tissues and other matrices. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Reviews; Tocopherols; Vitamins; Tocotrienols

**Contents**

1. Introduction .....	45
2. Vitamin E analysis .....	48
3. Sample treatment .....	48
4. Gas chromatography .....	57
5. High performance liquid chromatography .....	63
6. Normal-phase high-performance liquid chromatography .....	63
7. Reversed-phase high-performance liquid chromatography .....	64
8. Internal standard .....	64
9. Detection .....	65
10. Other methods .....	65
References .....	66

**1. Introduction**

Development of analytical methods which work in

a more rapid, simple and reliable manner than the existing ones is one of the objectives of analytical chemistry. The progress of performance features of analytical tools has been impressive in the last 10 years or less. Comprehensive reviews on vitamin E analysis have already been done [1–8]. Present

\*Corresponding author. Fax: +34-91-351-0475.

*E-mail address:* cbarbas@ceu.es (C. Barbas).

review focuses on discussing the contributions on the analysis of tocopherols and related substances mainly during the last decade, trying to give facts for those working in this area and trying to select an analytical method or to develop a new one.

Vitamin E is a term used to designate a family of related compounds (tocopherols and tocotrienols) which share a common structure, as shown in Fig. 1, with a chromanol head and a phytyl tail. They are named as a vitamin, because they cannot be synthesized by humans, and therefore must be obtained

from diet. Vitamin E is found in fat products of vegetal origin, mainly oils. Each oil has different amounts of vitamin E, and the proportion of tocopherol or tocotrienol can be very different, too. The phytyl tail of tocopherols molecule has three quiral centers (carbons 2, 4', and 8'), and organic synthesis from the reaction of trimethylhydroquinone with isophytol renders an enantiomeric equimolar mixture of the eight possible isomers, known as all *rac*- $\alpha$ -tocopherol. However in plants, specific enantiomeric synthesis occurs [9], and only RRR-forms

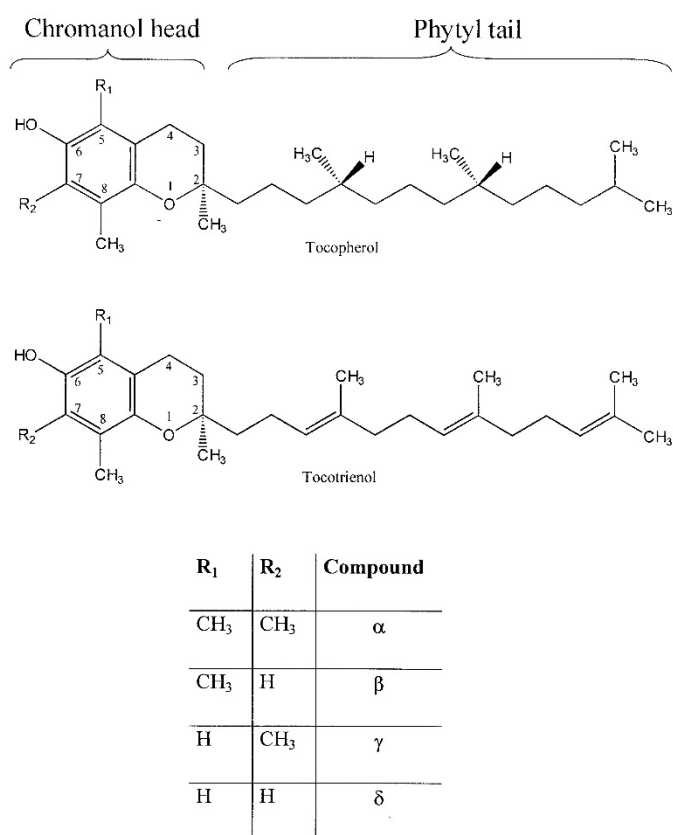


Fig. 1. Structure of tocopherols and tocotrienols.

are present for all the four possible tocopherols in samples from natural origin, with no extra vitamin E added.

Vitamin E is the natural most effective lipid soluble antioxidant [10,11], and the principal membrane antioxidant in mammalian cells, although antioxidant is not the only mechanism of action of this vitamin, because there are studies demonstrating activity of tocopherols or tocotrienols in cells and tissues that do not directly relate with antioxidant activity. Vitamin E decreases protein kinase C activity, and enhances both phospholipase A<sub>2</sub> and cyclooxygenase activity, and modulates several pathways involved in prevention of atherogenesis [12–14].

If oxidation of  $\alpha$ -tocopherol occurs in the organism, a variety of compounds appears [15,16]. In case that such oxidation of tocopherol does not exceed 20%, the main oxidation product is  $\alpha$ -tocopherolquinone (TQ), which could be reduced by cellular mechanisms to  $\alpha$ -tocopherolhydroquinone (THQ) [17]. Other products of tocopherol reactions with free radicals, as 5,6-epoxy- $\alpha$ -tocopherolquinone (TQE1) and 2,3-epoxy- $\alpha$ -tocopherolquinone (TQE2) can also be formed [16].

A number of oxidative products of tocopherols have been detected in urine including 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman ( $\alpha$ -CEHC) [18,19], metabolite of  $\alpha$ -tocopherol, and similar metabolites of  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol [20,21]. These compounds are derived from oxidation of the phytol side chain, while the chromanol structure remains intact indicating that  $\alpha$ -CEHC is derived from  $\alpha$ -tocopherol that has not reacted as an antioxidant and it may be used as an indicator of excess of  $\alpha$ -tocopherol supply in the body. With such discovery it has been questioned whether "Simon metabolites" with an open ring system ( $\alpha$ -tocopheronic acid and its lactone) [22] are a consequence of oxidation during sample preparation [23].

Different forms of  $\alpha$ -tocopherol have different biological activity. These differences are not only due to their ability for free radical-quenching, but also to the specific affinity of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP), which is a protein that specifically incorporates  $\alpha$ -tocopherol into lipoprotein particles during their assembly in the liver cells [24,25].  $\alpha$ -TTP may be responsible also for the different

activities of the different stereoisomers of  $\alpha$ -tocopherol.  $\alpha$ -TTP has much higher affinity for the 2R forms, and thus synthetic  $\alpha$ -tocopherol does not have the same biological activity as  $\alpha$ -tocopherol from natural origin [26].

The biological activity of vitamin E in animals is defined by its influence on symptoms of deficiency, including neuropathy, fetal death, or myopathy (muscle disease), and is dependent upon distinct regulatory processes. RRR- $\alpha$ -tocopherol or d- $\alpha$ -tocopherol is a single stereoisomer and is derived from vegetable oils, primarily soybean, sunflower and corn oils. Synthetic vitamin E (all-*rac*- $\alpha$ -tocopherol or dl- $\alpha$ -tocopherol) is a mixture of eight stereoisomers in equal amounts. The other seven stereoisomers have different molecular configurations and lower biological activities that range from 21 to 90% of the activity of natural vitamin E based on rat assays. Vitamin E content is generally expressed by biological activity, using the scale of International Units (IU). By this system, 1 mg of d- $\alpha$ -tocopherol, biologically the most active of the naturally occurring forms of vitamin E, is equivalent to 1.49 IU vitamin E. The biological activity of 1 mg of dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate, the synthesized form of vitamin E commonly used in food enrichment, is equivalent to 1 IU. Up until 1980, the recommended daily allowance (RDA) for vitamin E was expressed in IU. However, in 1980, the term tocopherol equivalents (TE) was used to express the RDA for vitamin E. One mg of d- $\alpha$ -tocopherol is equivalent to 1 TE. Other tocopherols and  $\alpha$ -tocotrienol in the diet were assigned the following values: 1 mg  $\beta$ -tocopherol=0.5 TE; 1 mg  $\gamma$ -tocopherol=0.1 TE, and 1 mg  $\alpha$ -tocotrienol=0.3 TE.

Quantification of other tocopherols is important in some studies.  $\gamma$ -Tocopherol, in comparison to  $\alpha$ -tocopherol, is more abundant in some diets, absorption in gut and intestines is the similar, its activity is 10–20% that of  $\alpha$ -tocopherol, and its plasma levels are 5 to 10 times lower than those of  $\alpha$ -tocopherol. In any case,  $\gamma$ -tocopherol or its metabolites may play a role in the protection of the body from damage by free radicals, because  $\gamma$ -tocopherol can be even more important than  $\alpha$ -tocopherol in preventing pernicious effects of some specific radicals, as peroxyinitrite and NO<sub>x</sub> [27–29].

In addition, separation and characterization of

various forms of tocopherols are required to assess the impact of genetic modifications of oil seeds on their distribution.

There are also other synthetic esterified forms of  $\alpha$ -tocopherol, obtained by esterifying the hydroxyl group of the chromanol head with either acetate, nicotinate, succinate or phosphate. These ester molecules are more stable and less susceptible to oxidation than  $\alpha$ -tocopherol. However, once ingested, the ester bond is easily split within the organism, and therefore these forms are used in medicine as sources of vitamin E for parenteral feeding, and are also used added to nutritional supplements, or to cosmetics (acetate). They are also used in the treatment of people with fat malabsorption, because of their higher water solubility (succinate, or synthetic vitamin E analogues derived from the non-phytyl form of vitamin E, e.g. 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol).

## 2. Vitamin E analysis

The first step for selecting the more adequate analytical method is to define the objective of the analysis and to know the sample matrix and complications related with it and with the analytes. The first question is then *which analytes?*, i.e., analyst should decide whether  $\alpha$ -tocopherol determination is enough for the purpose of the experiment, or if some other tocopherols and tocotrienols, and/or analogues, derivatized forms, metabolites, etc. should be analysed, or even if structural information is also needed. The fact that other non-vitamin E compounds are to be measured is one of the critical points in every method, because this would conditionate every step of the analysis. In tissues, compounds co-analyzed with tocopherol are retinoids and carotenoids, coenzyme Q<sub>10</sub> (ubiquinol and ubiquinone), and, in lesser extent, cholesterol, fatty acids and triacylglycerols. Tables 1–6 summarise the main characteristics of the methods currently in use. The different stages and outstanding contributions will be briefly discussed.

## 3. Sample treatment

Sample treatment is a critical step in the analytical

process. Manipulation is time consuming, expensive and the main source of errors and, therefore, it should be kept at a minimum if possible. Nevertheless, the relative amount of tocopherols in the sample to be analyzed can be very low, and sometimes preconcentration and highly sensitive methods are required.

Except for vitamin E analysis in oils, which can be directly injected onto the HPLC system after dilution, vitamin E must be extracted from the sample matrix and concentrated in many cases. Vitamin E is not chemically bound to proteins, lipids or carbohydrates [12] and using harsh reagents and conditions to free it up (e.g. strong saponification) does not seem necessary and can destroy the vitamins. However, if adequate conditions are not used to release the vitamin from lipophilic milieu, recoveries will be poor, because vitamin E could be associated to other matrix components and must be freed up in the sample preparation steps.

Esters could need to be hydrolysed to the free form prior to the analysis and then total tocopherol content is measured, but in most cases, the same conditions could be applicable to the determination of free or acetate form (in normal-phase HPLC, in the same time of chromatography, and in reversed-phase HPLC, only some more min), as it was previously proposed [30].

Sample must be treated with some organic solvent, previous to or simultaneously with saponification or extraction process, in order to disrupt the structures where vitamin E can be associated to (membranes, lipoproteins, fat droplets . . .), to eliminate interferences from big molecules such as proteins or carbohydrates, that are non-soluble in organic phases, and to provide a medium in which analytes can be freely soluble. This organic solvent is almost always ethanol, but methanol is used too (see Tables 1–6). SDS (sodium dodecyl sulphate) as modifier for sample preparation previous to extraction was described by Burton et al. [31] and such an additive has been adopted by many researchers [32–39].

Sample treatment for vitamin E analysis often includes saponification, of the entire sample matrix, or of an isolated lipid fraction. Saponification prior to extraction is classically performed by heating with KOH, frequently in ethanol or methanol.

Following saponification, the unsaponifiable com-

Table 1  
Summarized characteristics of the methods to analyze  $\alpha$ -tocopherol in pharmaceuticals and medical food preparations

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Medical food	All- <i>rac</i> - $\alpha$ -tocopherol acetate, $\gamma$ -tocopherol, $\delta$ -tocopherol	Extraction in 2-propanol and hexane–ethyl acetate  BIIT added	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC– fluorescence	Isocratically 2-propanol–hexane (0.5:99.5, v/v)	Retinol palmitate can be measured changing mobile phase	[84]
Medical food	All- <i>rac</i> - $\alpha$ -tocopherol acetate	Matrix solid-phase dispersion in Bondsil C <sub>18</sub>	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC– fluorescence	Isocratically 2-propanol–hexane (0.5:99.5, v/v)	Retinol palmitate can be measured changing mobile phase	[72]
Multivitamin tablets	Retinol, retinol acetate, tocopherol succinate, $\gamma$ -tocopherol, $\alpha$ -tocopherol acetate, $\alpha$ and $\beta$ -carotene	Hexane extraction	Non-aqueous RP (Symmetry C <sub>18</sub> ) HPLC–UV	Step gradient  Acetonitrile–0.25% ammonium acetate in methanol and 0.05% triethylamine in dichloromethane		[132]
Vitamin E-supplemented concentrates	$\alpha$ -Tocopherol acetate	Hexane extraction and/or enzymatic digestion	GC–FID	Isothermal 265°C	Colaborative assay Hexadecyl palmitate or dotriacontane as I.S.	[133]
Tablet preparations	Vitamin A, vitamin E and their esters acetate and palmitate	Supercritical fluid extraction (SFE) with CO <sub>2</sub>	Non-aqueous RP (LiChrospher CH-8) HPLC–UV	Isocratic Methanol–acetonitrile (75:25, v/v)		[75]
Semisolid gelled preparations		Dissolution in ethanol	RP C <sub>18</sub> HPLC–UV	Methanol–water (93:7, v/v)	Retinol acetate as I.S.	[98]
Synthesized vitamin E	Two enantiomers of $\alpha$ -tocopherol and two structural isomers		MEKC–UV	7 mM borate, 14 mM phosphate, 15 mM SDS, 10 mM sodium cholate, 8% acetonitrile	Poor sensibility and recovery	[124]

ponents including vitamin E are extracted into the organic solvent, while fatty acid salts, glycerols and other potentially interfering substances remain in the alkaline aqueous phase. Several factors may interfere in the extraction of vitamin E from the saponification medium as evaluated by Ueda et al. [40]. Among these factors organic solvent, ethanol concentration and the levels of lipids used in the digest are included.

Nevertheless, the saponification is time consuming and complex. It has been mainly employed in food and samples of animal origin. De Leenheer et al. already in 1979 did prove that saponification was not needed, and results were not different from that of normal extraction [41]. Anyway, methods with or without saponification have been applied to the same type of sample by different scientists.

To overcome oxidation of fat-soluble vitamins

Table 2  
Summarized characteristics of the methods used to analyze  $\alpha$ -tocopherol in diverse samples

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/detection	Conditions <sup>a</sup>	Comments	Ref.
Tobacco smoke		Collected in Fluoropore membrane and extracted with methanol	RP (Vydac 201TP104) HPLC–fluorescence	Methanol–water (88:12, v/v)		
Olive by-products	Four tocopherols	SFE with CO <sub>2</sub>	GC–MS	Methylsilicone column from 230 to 275°C		[76]
Oil palm leaflet		Methanol–chloroform extraction	NP (Zorbax Sil) HPLC–fluorescence	Hexane–THF–methanol (97.25:2.5:0.25, v/v/v)		[134]
Palm-oil extract	Four tocotrienols and $\alpha$ -tocopherol	Dissolution in ethanol	RP C <sub>18</sub> (laboratory-made)–UV–MS–NMR	Methanol–Silver ions added prior to MS	Unambiguous structural assignment	[122]
Vegetable oil, soybean oil, deodorizer distillate, mixed tocopherol concentrate and pharmaceutical preparations	Four tocopherols	Dilution with 2-propanol or THF	RP (Taxisil, pentafluorophenyl) HPLC–UV	Methanol–water (92:8, v/v)	The four isomers separated in RP	[99]
Standards	Four tocopherols and 5,7-dimethyltocol		NP cyclodextrin-bonded silica (CDS)–fluorescence	Hexane or cyclohexane in combination with alcohol, ether or esters in binary and ternary mobile phases	Excellent separations in most cases. Comprehensive approach to explain the interactions of tocots and CDS	[135]

<sup>a</sup> THF=Tetrahydrofuran.

caused by saponification, some investigators have added antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT) [42], ascorbic acid [32,43,44], pyrogallol [34,45], each one alone, or combinations [46,47].

The antioxidants have also been used even though no saponification was to be applied: BHT [32,34,36,38,39,48–52], pyrogallol [53], ascorbic [37] or ascorbic and BHT [54] have been used. For determination of  $\alpha$ -tocopherol, in most cases the addition of antioxidants has not been considered necessary, and most methods have been developed without antioxidants. However, if some other more labile compounds are to be analysed [47], special matrices

are going to be analysed [30], or saponification is needed, then the presence of antioxidants in sample treatment may be important. Nevertheless, antioxidants do not ensure the accuracy: In fact, a recently described method uses BHT, pyrogallol and ascorbic, and recovery from samples was 86% [46]. In addition, Su et al. [55] tested stability of tocopherols and other analytes in human plasma during sample processing, and found tocopherol to be stable exposed to fluorescent light at room temperature for at least 4 h, and after 24 h a loss of only 4% was found, with no antioxidant present in the sample.

In our experience when analyzing vitamin E in

Table 3  
Summarized characteristics of the methods used to analyze  $\alpha$ -tocopherol in foods

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Vegetable oils, formulated preparations and biscuits	Tocopherols and tocotrienols	Extraction and silica Sep-Pak purification compared with saponification	RP ( $\mu$ -Bondapak $C_{18}$ ) HPLC–UV and fluorescence	Methanol–water (95:5, v/v)	Significant differences with and without saponification were found	[74]
Seed oils	Tocopherols, tocotrienols, tocotrienols and plastoquinone-8	Hexane dilution	Amino-cyano HPLC–fluorescence	Hexane–tetrahydrofuran (94:6, v/v)	LOD for $\alpha$ -tocopherol 1 ng	[136]
Vegetable oils	Four tocopherols	Hexane–methanol dilution	RP (ODS-2) HPLC–UV	Methanol–water (96:4, v/v)	$\alpha$ -Tocopherol acetate as I.S.	[100]
Virgin olive oil	Tocopherols, carotenoids and chlorophylls	Hexane–2-propanol dilution	NP-HPLC (LiChrospher-Si) UV–Vis diode array	Gradient Hexane–2-propanol		[85]
Olive and hazelnut oil	Tocopherols and sterols	Saponification with pyrogallol added, extraction in cyclohexane, concentration, derivatization to <i>O</i> -trimethylsilyl ethers	GC–FID or MS	Temperature gradient from 230 to 294°C	Discriminant analysis that permits oil identification 5,7-Dimethyltolcol as I.S.	[137]
Food oils	Four tocopherols	Hexane dilution	Non-aqueous $RPC_{18}$ HPLC–fluorescence	Methanol–acetonitrile (50:50, v/v)	5,7-Dimethyltolcol as I.S.	[115]
Vegetable oils	Four tocopherols and sterols	SPE with silica gel	GC FID	Step gradient from 70 to 350°C	5,7-Dimethyltolcol as I.S.	[73]
Vegetable oils	Three tocopherols	Continuous membrane extraction from oil samples dissolved in Triton X-114	RP (OD-224 Brownlee Labs $C_{18}$ )–Electrochemical (coulometric) detection	2.5 mM acetic acid sodium acetate in methanol–water (97:3, v/v)	Validated with a BCR Reference Material 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol as I.S.	[138]
Vegetable oils	Three tocopherols	Dilution with hexane and ethanol	RP (Tracer Extrasil ODS-2)–UV	Methanol–water (96:4, v/v)	Tocopherol acetate as I.S.	[100]
Vegetable oils	Three tocopherols and $\beta$ -carotene	Saponification with ascorbic acid added, and extraction with hexane–ethyl acetate	RP (Tracer Extrasil ODS-2)–UV	Gradient with methanol–water–butanol		[100]
Vegetable oils	Four tocopherols	Saponification with pyrogallol added, extraction with light petroleum, concentration and dehydration with sodium sulphate	ODS-silica gel column–fluorescence	CO <sub>2</sub> and methanol as modifier	Comparison with NP-HPLC Tocol as I.S.	[116]



Table 3. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Marine oils	Various tocopherols, triacylglycerols, free fatty acids, squalene, retinol, cholecalciferol, cholesterol and wax esters	Dilution in heptane	Capillary supercritical fluid chromatography (SFC), non-polar column—FID	CO <sub>2</sub>	Fingerprints of marine oils. Poor resolution for tocopherol	[139]
Edible oils and fats	Triacylglycerols and tocopherols	Dissolution	SFC cyanopropyl-phenyl-methylpolysiloxane capillary column—FID	CO <sub>2</sub>	Characterization of oils. Poor resolution and sensitivity for tocopherols. Two injections needed	[126]
Soy-based infant formula	All- <i>cis</i> - $\alpha$ -tocopherol acetate, $\gamma$ -tocopherol, $\delta$ -tocopherol	Extraction in 2-propanol and hexane-ethyl acetate BHT added	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC—fluorescence	Isocratically 2-propanol–hexane (0.5:99.5, v/v)	Retinol palmitate can be measured changing mobile phase	[2]
Margarine and reduced fat products	Three tocopherols	Hexane extraction with anhydrous MgSO <sub>4</sub>	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC—fluorescence	Hexane–2-propanol (99.1:0.9, v/v)	LOD ranging from 23.2 to 1.98 $\mu\text{g}/100\text{ g}$	[86]
Margarine, infant foods and vegetables	Three tocopherols and tocotrienols	Saponification for 40 min at 80°C, extraction with hexane ethylacetate, evaporation and dissolution in hexane–BHT	NP (LiChrosorb Diol) HPLC—fluorescence	Hexane– <i>tert</i> . butyl methyl-ether (94:6, v/v)	Some interferences. Recoveries ranging from 91 to 105% LOD=0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	[42]
Margarines and margarine-like products		Saponification, extraction with light petroleum, evaporation and dissolution in hexane	RP ( $\mu$ -Bondapak) HPLC–UV–Vis	Methanol–water (94:6, v/v)	Retinol and $\beta$ -carotene measured in the same extract with different conditions or columns	[101]
Baby food composite	Carotenoids, retinoids and tocopherols	Extraction followed by saponification as compared with saponification followed of extraction	RP (C <sub>18</sub> ) HPLC–UV–Vis		Comparison of results and uncertainties	[140]
Standard Reference Material 2383						
Infant milk formulae	Retinol	Saponification at room temperature, subdued light and addition of ascorbic acid. Hexane BHT extraction, evaporation and dissolution in methanol	RP (Trace Spherisorb ODS 2 C <sub>18</sub> ) HPLC–UV–Vis	Water–acetonitrile–methanol (4:1:95, v/v/v)		[43]

Table 3. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Milk powder	Vitamin A	SFE with CO <sub>2</sub> modified with 5% methanol followed of miniaturised saponification for ester hydrolysis	RP (LiChrospher RP-18) HPLC UV-Vis	Methanol–water (96:4, v/v)	96 and 99% recoveries	[77]
Milk-based products	Vitamins A and E	Antioxidant addition, saponification, extraction, evaporation and redissolution in methanol	RP (Ultrasbase C <sub>18</sub> ) HPLC UV	Methanol–2-propanol (90:10, v/v)	AOAC official method of sample treatment but fully automated using a robotic station	[102]
Italian cheeses	Tocopherols, carotenes and retinol	Saponification, extraction with hexane–ethyl acetate, evaporation and dissolution in mobile phase	NP (Ultrasphere Si) HPLC–UV-Vis and fluorescence	Multilinear gradient with 2-Propanol–hexane	Data of cheeses and milks. Changes in column performance due to water accumulation	[141]
Dairy products with olive, basil or banana and cheese with tomato	Three tocopherols, total retinols, carotenes and several sterols	Saponification, extraction with hexane–ethyl acetate, evaporation and dissolution in methanol–dichloromethane (9:1)	RP (Supelco C <sub>18</sub> ) HPLC–UV and fluorescence	Methanol		[103]
Dairy products, foods and tissues	Tocopherols and $\alpha$ -tocopherol acetate	Saponification and extraction in the same test-tube	NP (silica) and RP (C <sub>18</sub> ) HPLC–fluorescence	Hexane–2-propanol (99:1, v/v) for NP methanol 100% for RP	Comparison of experimental and literature data for different procedures	[87]
Diet and tissues	Vitamin E forms	Hexane extraction of the frozen sample. Saponification only employed when tocopherol esters were present	NP (Supelcosil LC-Diol)–fluorescence	Hexane–2-propanol (99:1, v/v)	5,7-Dimethyltocol	[88]
40 Food products	Three tocopherols	Saponification followed of hexane extraction	RP (Zorbax ODS) HPLC–fluorescence	Acetonitrile–methylene chloride–methanol (70:30:5, v/v/v)	Vitamin E data for food product important to the U.S. dietary	[142]
Key Foods in the U.S. Diet	Tocopherols and tocotrienols	Depending of the matrix: (i) Soxhlet extraction, (ii) saponification, (iii) Folch extraction	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC–fluorescence	Hexane–2-propanol (99:1, v/v)	Tabulated data	[143]
Foods	Cholesterol, phytosterols and tocopherols	Saponification and extraction with hexane–diisopropylether in the same test-tube	NP (silica) and RP (C <sub>18</sub> ) HPLC–fluorescence and UV-Vis	Hexane–2-propanol (99.9:0.1, v/v) for NP, methanol 100% for RP		[89]

semisynthetic diets, to avoid the different oxidation processes that may occur both in aqueous and in organic phases and that can affect tocopherols is a

critical point, and the same may be so in medical foods analysis. In fact, inorganic ions added to the diet as copper or iron can promote lipid oxidation

Table 4  
Summarized characteristics of the methods used to analyze  $\alpha$ -tocopherol in animal diet

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/detection	Conditions	Comments	Ref.
Animal feedingstuffs		Saponification, extraction in light petroleum, evaporation and redissolution in hexane	NP (Partisil 5 Si) HPLC–fluorescence	Isooctane 2-propanol		[144]
Rodent feed	Vitamins A and E	Saponification with ascorbic acid added, hexane extraction	Normal-phase (LC-CN) HPLC–UV	Hexane–2-propanol glacial acetic acid (99:1:0.02, v/v/v)		[145]
Animal feeds	Vitamins A, D, E and pro-vitamin D2	Acetone–chloroform extraction, evaporation, <i>n</i> -butanol redissolution	RP (Novapak C <sub>18</sub> ) HPLC–UV	Methanol	LOD 10 ng/g for the four vitamins. Various analytical conditions tested.	[68]
Aquatic organisms and feed	$\alpha$ -Tocopherol acetate and tocopherols	Extraction with methanol–BHT	RP (Hypersil ODS) HPLC–fluorescence and UV	Methanol–water (96:4, v/v)	LOQ 0.2 $\mu$ g/ml in spiked samples Tocol as I.S.	[104]
Diets of animals	$\alpha$ -Tocopherol acetate	Addition of EDTA and BHT, hexane extraction, evaporation and dissolution in chloroform–methanol	RP (Nucleosil C <sub>18</sub> ) HPLC–fluorescence	Methanol–water (96:4, v/v)	Phenylododecane as I.S.	[57]

and subsequent tocopherol oxidation [56]. This may be prevented by adding EDTA, plus an organic phase soluble antioxidant such as BHT [57].

Some of the most commonly used solvents for vitamin E extraction include the Folch extraction with chloroform–methanol (2:1), acetone, diethyl ether and Soxhlet extraction with a variety of solvents. Wet samples can be ground in the presence of anhydrous sodium or magnesium sulphate to facilitate extraction. The solvent must be capable of effectively penetrating tissues, and for this, extraction is usually achieved by strong vortexing or shaking. In our hands we have applied probe sonication for the extraction of tissues and diets with very good results [30,57,58]. It is however advised that sonication should not be too intense, because samples warm up easily, and ultrasounds can produce free radicals [59].

Hexane, alone or with little amounts of more polar solvents as ethanol or ethyl acetate, or diisopropylether (never more than 5%) is the most frequently used extractant. Nevertheless, its effectiveness may not be as high as that of other organic solvents [60,61] because there can be a problem if

phases are very non-miscible, and probably hexane does not interact with all the molecules of analyte. Working with internal standard partially corrects this non-effectiveness, and recoveries are not affected, but in some cases sensitivity could be augmented if working with solvents like propanol [62], acetone [63–65], or other solvent mixtures [61]. In the other hand, solvents as acetone can have the problem of mixing with the aqueous phase. Other solvents as acetone can have the problem of mixing with the aqueous phase, which would affect the unpredictable dilution of the sample, with its subsequent calculi mistakes.

If vitamins have been extracted with hexane or heptane, and chromatography is going to be performed by reversed-phase HPLC, solvent must be evaporated and replaced by other solvent more similar to mobile phase, or by the mobile phase itself. To avoid this evaporation–redissolution process, other organic solvents in which vitamins are soluble, eliminate interferences and not interfere with separation of analytes in HPLC have been investigated [61,65,66]. Therefore, with these solvents, sample pretreatment is attained in one step

Table 5  
Summarized characteristics of the methods used to analyze  $\alpha$ -tocopherol in plant samples

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Spinach	Three tocopherols and $\alpha$ -Tocopherol acetate	Lyophilisation, extraction, evaporation and dissolution in methanol	RP (Spherisorb ODS) HPLC–UV	Methanol–water (95:5, v/v)	Only $\alpha$ -tocopherol detected in raw, frozen and canned spinach	[105]
Grain and seeds	Antioxidant capacity	Freezing, ground, extraction and incubation with reagent solution	Spectrophotometry of phosphomolybdenum complex		Compared with HPLC	[131]
Soybean	Four plant tocopherols	Only standards processed	NP (aminopropylsilica or diol-bonded silica) HPLC–fluorescence	Binary solvent systems comprising a hydrocarbon and an alcohol, an ether or an ester	Examination of structural effects on HPLC behaviour on different polar phases. 5,7-Dimethyltolcol as I.S.	[94]
Soybean oil, wheat germ, wheat bran and rubber latex	Three tocopherols and four tocotrienols	Extraction of crude oil, saponification, crystallization and dissolution	Semi-preparative, NP (Alltech Econosil) HPLC–fluorescence and UV Vis	Linear gradient with tetrahydrofuran and hexane	The purpose of the work is the isolation of highly purified tocopherols and tocotrienols as analytical standards	[146]
<i>Brassica oleracea</i>	Carotene and tocopherols	Saponification, extraction, evaporation and dissolution	RP (Prodigy ODS) HPLC–UV–Vis	Acetonitrile–methanol–THF (52:40:8, v/v/v)	Ascorbate extraction and analysis is also described	[147]
<i>Brassica napus</i> L. single seeds	Three tocopherols	Isooctane extraction	NP (LiChrospher 100 diol) HPLC–fluorescence	Isooctane <i>tert</i> -butylmethylether (94:6, v/v)	$\beta$ -Tocopherol as I.S.	[148]
<i>Rosmarinus officinalis</i> and <i>Salvia officinalis</i>	Phenolic diterpenes and tocopherols	Liquid fat was extracted and purified in methanol	RP (Hypersil ODS) HPLC–electrochemical	Gradient Solvent A: methanol–water–2 mol citric acid TEAH.  Solvent B: methanol–2 mol citric acid TEAH.		[149]
Fifteen plant species		Air-dried leaves grounded and extracted with hexane by percolation. Purification with column chromatography in silicagel	GC (capillary OV-17 column) FID	Gradient of temperature from 200 to 320°C	Antioxidant activity was also evaluated.  $\alpha$ -Tocopherol acetate as I.S.	[119]
Pumpkin seeds	Three tocopherols and four tocotrienols	Hexane extraction	NP (LiChrosorb Si 60) HPLC fluorescence	Hexane–dioxane (96:4, v/v)		[150,151]

Table 5. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Oil plant seeds and corn products	Three tocopherols	Extraction and filtration	NP( $\mu$ -Bondapak NH <sub>2</sub> ) HPLC-UV	Hexane–2-propanol (98.7:1.3, v/v)		[152]
<i>Xanthium strumarium</i>	$\gamma$ -tocopherol	Extraction with acetone, concentration, washing in separation funnel, alumina column chromatography and TLC for purification	GC (AW Chromosorb W glass column) FID			[153]
Spinach thylakoid		Mixture with SDS and extraction with ethanol– <i>n</i> -heptane. Evaporation of the organic phase and dissolution in ethanol	RP (Supelcosil ODS) HPLC–UV	Methanol–water (98:2, v/v)		[106]
Oregano	Three tocopherols	Air-dried leaves extracted with hexane. Saponification and injection of the unsaponifiable fraction	NP (LiChrospher Si 60) HPLC–UV	Hexane–2-propanol (99:1, v/v)		[90]
Maize leaves		Extraction with acetone buffered with Tricine and ascorbate. Re-extraction with hexane, evaporation and dissolution in methanol	RP (Supelcosil LC 18) HPLC–amperometric	Methanol–acetonitrile–acetate buffer (50:40:0.75, v/v/v) followed by ethyl acetate for 1 min		[154]
Plant tissue		Saponification, hexane extraction, evaporation and dissolution in hexane	NP (Spherisorb 5S NH <sub>2</sub> ) HPLC fluorescence	Hexane–2-propanol (99:1, v/v)	Small scale method	[91]
Plants	All major photosynthetic pigments, tocopherols, carotenoids and intermediates	Acetone extraction of frozen leaves	RP (Spherisorb ODS-1) HPLC–fluorescence and UV–Vis	Gradient Solvent A, acetonitrile–methanol–water (84:9:7, v/v/v). Solvent B, methanol ethyl acetate (68:32, v/v)	Identification of 20 components in the same run. Quantitative data not included	[155]
Vegetable extracts, vitamin drink and a commercial infant food	Carotenoids, tocopherols and tocopherol acetate	Dichloromethane extraction	RP (polymeric C <sub>30</sub> ) HPLC–UV–Vis and MS	Linear gradient acetone–water. Post-column derivatization with silver ions	LOD 300 fmol for $\beta$ -carotene	[123]
Leaves of six edible plant species	Tocopherols and tocotrienols	Leaves dipped in hot water. Total lipids extracted with chloroform methanol and pigment removed with activated charcoal	NP (Zorbax Sil) HPLC fluorescence	Hexane–THF–methanol (97.35:2.5:0.15, v/v/v)		[156]

Table 5. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Oat ( <i>Avena sativa</i> L.) extracts		Evaporation of extracts and dissolution in hexane	NP ( $\mu$ Porosil) HPLC fluorescence	Hexane–2-propanol (99.5:0.5, v/v)	Correlation of antioxidant capacity and phenolic and fecol antioxidants	[92]
Rice Bran	Two novel tocotrienols plus the known four tocopherols and tocotrienols	Hexane extraction, evaporation and re-dissolution	NP (silica) HPLC–fluorescence	Hexane–2-propanol (99.8:0.2, v/v)	Structural data and purification system for the two novel tocotrienols	[93]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. and <i>Melissa officinalis</i> L.		Methanol extraction, evaporation and re-dissolution in acetonitrile	RP (Hypersil ODS) HPLC–UV	Acetonitrile–water (citric acid 2 M) (98:2, v/v)	Abietane diterpenes analysis is also described	[157,158]

only, just by adding this solvent to the sample. Extraction has also been done with butanol–ethyl acetate, with direct injection of an aliquot of the upper layer [67].

In addition, Qian et al. [68] have tested several conditions that may affect the analysis, including sample particle size, extraction solvents, ratio of solvent to sample, extraction approach, extraction time, N<sub>2</sub> protection, prepurification, etc. Results have been evaluated compared to the AOAC method [69].

Nowadays, sample preparation methods are considered the central point in methods development and several techniques have been developed as alternative to liquid–liquid extraction. Although recently starch-talk layers have been applied to the analysis of plant lipids and have demonstrated to be of potential utility in the purification and quantitation of lipid antioxidants [70], TLC and column chromatography, the oldest types of chromatography, are currently applied to sample clean up [54,71].

The use of solid-phase extraction has proven to be an efficient technique for simplifying sample clean-up prior to HPLC analysis [34,72–74].

The use of supercritical fluids to perform extractions is a relatively new technology with a large potential for future. Behind the recent expansion in use are environmental concerns, such as the need to eliminate organic solvents and to find alternatives for incineration. Some laboratories [75–77] are extracting fat soluble vitamins from foods or tablet preparations using carbon dioxide in the form of a super-

critical fluid. This technique, called supercritical fluid extraction (SFE), is rapid and generates little or no hazardous reagent and solvent waste.

#### 4. Gas chromatography

GC–flame ionization detection (FID) is a technique that preceded HPLC. Methods for determining vitamin E with this technique are known since the early 1970s [78,79] but nowadays it has been used at a lesser extension. The GC analysis of tocopherols normally implies warm saponification, TLC separation, and formation of the trimethylsilyl derivatives prior to the chromatographic injection. Recently Lechner et al. [73] isolated the silyl derivatives by solid-phase extraction (SPE) and quantified them by GC–FID. Derivatizations has been done by heating a purified extract with *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) [73,80], *N,O*-(bis-trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BTSFA)–trimethylchlorosilane (TMCS) (10:1, v/v) [33] and with TriSil Z-reagent (trimethylsilylimidazole–pyridine) [81].

The main goal of GC is the coupling to MS for the identification of metabolites. It has been applied to fractions collected from HPLC [80], for structural elucidation of the compounds [32]. If deuterated compounds are available, identification of estereoisomers is possible too [11]. GC–MS has been

Table 6  
Summarized characteristics of the methods used to analyze  $\alpha$ -tocopherol in animal tissues

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Human plasma and lipoproteins	Free and esterified cholesterol, triacylglycerols	Ethanol precipitation. Hexane extraction–evaporation. Redissolve in ethanol.	RP (Hitachi Gel 3057 ODS) HPLC–UV FL	Acetonitrile–2-propanol (75:25)	Cholesteryl benzoate or heptadecanoate as I.S.  Sample can be as little as 5 $\mu$ l	[159]
Rat plasma, liver, lung, manna	5 retinoids, 8 carotenoids, $\alpha$ -tocopherol acetate	Plasma: add NaCl.  Tissues: homogenize with ascorbic, EDTA, acetic.  Methanol (BHT) precipitation. Chloroform extraction–evaporation	RP (Nucleosil C <sub>18</sub> or Hypersil ODS) HPLC–UV	Nucleosil: acetonitrile–ammonium acetate (70:30)  Hypersil: acetonitrile–methylene chloride–methanol–water (70:10:15:5)	Methods developed for retinoids and carotenoids analysis. $\alpha$ -tocopherol can be measured in both conditions. Ethanol for precipitation and hexane for extraction are also tested.  LOD=60 ng/ml	[48]
Liver of farm animals	Retinol, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -tocopherol and $\alpha$ -tocotrienol	Add ascorbic, methanol precipitation, saponification, hexane:toluene (1:1) extraction	NP (LiChrosorb Si 60), HPLC–FL	Hexane (3% 1,4-dioxane)	Recovery 92–100%	[95]
Human red blood cells	$\alpha$ -Tocopherol quinone	Saponification (antioxidant), hexane extraction–evaporation	RP (Ultrasphere ODS) HPLC–ED	Methanol–acetonitrile–phosphate buffer (83:12:5)	Tocol as I.S.  Recoveries 80–100% depending on antioxidant.  LOQ=50 pg  BHT, ascorbic, and pyrogallol (and combinations)	[47]
Human plasma, lung, colon, breast, skin	Retinol, lutein, cryptoxanthin, lycopene, $\alpha$ - and $\beta$ -carotene	Enzymatic digestion (collagenase) with ascorbic, homogenization, ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (Ultrasphere ODS) HPLC–UV	Acetonitrile–THF–methanol–1% ammonium acetate (65:25:6:4)	$\alpha$ -Tocopherol nicotinate as I.S.  Different homogenization procedures, saponification, or SDS are tested as well as two other columns	[160]
Human plasma (premature newborns)	Retinol, retinol palmitate	Ethanol precipitation. Hexane extraction–evaporation	RP (Superspher RP <sub>18</sub> ), HPLC–UV	Gradient: (A) Acetonitrile–water (90:10) (B) Ethyl acetate–2-propanol (90:10)	Tocol of own synthesis as I.S.  Recovery=93%  LOD=1.3 $\mu$ g/ml	[117]
Plasma	( $\gamma$ + $\beta$ )-Tocopherol	n-Butanol ethyl acetate acetonitrile (1:1:1) extraction	RP (Superspher RP <sub>18</sub> ), HPLC–ED	Methanol ethanol (10:90), 2.5 mM perchloric acid, 7.5 mM sodium perchlorate	$\delta$ -Tocopherol as I.S.  LOD=60 pg (3 ng/ml plasma)	[61]
Human serum, rat serum, brain, lung, heart, liver and kidney	Oxidized and reduced coenzyme Q and homologues	Ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation.	RP (Capcell Pak C <sub>8</sub> ), HPLC–Postcolumn Pt reduction–ED	Ethanol–methanol–water (82:8:10), 0.05 M sodium perchlorate	8-Menaquinone as I.S.	[112]

Table 6. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Human plasma	$\gamma$ -Tocopherol, lycopene, $\beta$ -carotene, ubiquinol, ubiquinone	Ethanol precipitation, hexane extraction evaporation.	(Two methods) RP, HPLC-ED	Method 1: Methanol-water (96:4), 20 $\mu$ M lithium perchlorate.  Method 2: Methanol-ethanol-2-propanol (22.5:73.6:3.9), 20 mM lithium perchlorate		[107]
Rat plasma, red blood cells, liver, brain, adipose tissue, adrenal glands	( <i>RRR</i> -, <i>RRS</i> -, <i>RSS</i> -, <i>RSS</i> -, <i>SSS</i> -) ( <i>SSR</i> -, <i>SSS</i> -) <i>SRS</i> -, <i>SRR</i> - $\alpha$ -tocopherol, <i>RRR</i> - $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -Tocopherol (all in acetate form)	NaCl 1%, ethanol (pyrogallol) precipitation, saponification, NaCl 1%, hexane (10% ethyl acetate) extraction evaporation, acetylation: pyridine-acetic anhydride, NaCl 1%, hexane extraction-evaporation	Chiral phase (Chiralpak OP (-)), HPLC-UV	Methanol-water (96:4)	Recoveries between 90 and 100%  2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-hydroxychroman as I.S.	[45]
Human plasma (neonates) and erythrocytes		Ethanol (pyrogallol), precipitation, hexane extraction-evaporation	RP (Spherisorb ODS), HPLC-UV	Methanol	Tocopherol acetate as I.S.	[53]
Plasma and tissues	$\gamma$ -, $\delta$ -, $\beta$ -Tocopherol ( $\gamma$ -, and $\beta$ - not resolved in RP), $\gamma$ -, $\delta$ -, $\beta$ -tocotrienol	Add ascorbic, methanol precipitation, saponification, hexane-toluene (1:1) extraction	(Two methods) NP (LiChrosorb Si60) and RP (Ultrasphere ODS), HPLC-FL	(1) Hexane (3% 1,4-dioxane)  (2) Acetonitrile-tetrahydrofuran-methanol ammonium acetate 1% (68.4:22.6:8.2:8)		[96]
Rat plasma and liver, brain, adipose tissue	<i>RRS</i> -, <i>RSS</i> -, <i>RSS</i> -, <i>SSS</i> -, <i>SSR</i> -, <i>SRS</i> -, <i>SRR</i> - $\alpha$ -Tocopherol	SDS mixed, methanol (BHT) precipitated, heptane (BIIT) extraction, dried with sodium sulphate, evaporation. Purification of tocopherols by repeated HPLC.  Alternative: homogenize in methanol (ascorbic), saponification, purification in Extrelut column with isooctane, evaporation, purification in Kieselgel Si60 column with hexane (2% ethyl acetate), evaporation. Purification of tocopherols by single HPLC.  Methylation of purified tocopherol.	(Two methods)  (1) Chiral phase (Chiralcel OD) HPLC-UV  (2) Capillary GC (GC Silar 10)	(1) Hexane  (2) Isothermal 165°C		[32]



Table 6. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Human plasma (neonates)	Ubiquinol-10, ubiquinone-10, $\gamma$ -tocopherol, $\beta$ -cryptoxanthin, $\beta$ -carotene	Ethanol (BHT) precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (SuperPac Pep-S RP $C_{18}$ ) HPLC–ED	Methanol–Ethanol–2-propanol (88:24:10), 13.4 mM lithium perchlorate	I.S.: $\gamma$ -tocotrienol, ubiquinone-7, ubiquinol-9, ubiquinone-9, ethyl $\beta$ -apo-8'-carotenolate	[113]
Pork adipose tissue and muscle		Saponification (ascorbic with or without KI), ethanol precipitation, hexane–toluene (1:1, BHT) extraction–evaporation	NP (LiChrosorb Si60). HPLC–FL	Hexane ethyl acetate (95:5)		[44]
Rat liver microsomes	TQE1, TQE2, TQ, TIIQ	Add SDS, ethanol, hexane extraction–evaporation. Dissolve in ethanol–HCl (1:1). Hexane extraction–evaporation. Treat with BSTFA–TMCS (10:1)	GC–MS (DB-5 ms column)	Programmed temperature	$[^2H_4]$ TH, $[^2H_6]$ -TQE1, $[^2H_6]$ -TQE2, $[^2H_6]$ -TQ, $[^2H_3]$ -TIIQ as I.S.	[33]
Mice brain, heart, kidney, liver and skin	$\gamma$ -Tocopherol, $\alpha$ -, and $\gamma$ -tocotrienol, ubiquinol-9 and -10, ubiquinone-9 and -10	Skin: homogenized in buffer (NaCl, EDTA, $Na_3PO_4$ ) (BHT), SDS added, ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation.  Other tissues: homogenate with SDS, ethanol precipitation, heptane extraction	RP (Ultrasphere ODS). HPLC–UV–ED	Gradient: (A) Methanol–water (80:20), 0.2% $LiClO_4$  (B) Ethanol, 0.2% $LiClO_4$	LOD: 0.1 pmol	[35]
Aquatic organisms: <i>Artemia</i> , rotifers, turbot, sea bass larvae, shrimp postlarvae	$\gamma$ -, $\delta$ -Tocopherol	Alternatively:  (a) Homogenize in methanol (BHT). SPE cleanup with hexane–2-propanol (97:3)  (b) Homogenize in methanol (BHT), saponification (pyrogallol), light petroleum–diisopropyl ether (3:1) extraction–evaporation  (c) Homogenize in methanol (BHT), hexane extraction–evaporation  (d) Homogenize in methanol–SDS (BHT). Hexane extraction–evaporation  (e) Homogenize in hexane–methanol (2:1). Hexane reextraction–evaporation.	RP (Hypersil ODS). HPLC–FL	Methanol–water (96:4)	Tocol as I.S. in every method	[34]

F.J. Rupérez et al. / J. Chromatogr. A 935 (2001) 45–69

61

Table 6. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Human plasma, lipoproteins		(a) NaCl, ethanol precipitation (BHT), hexane or ethyl acetate extraction–evaporation  (b) Dilution with methanol–ethanol (8:1, BHT, $\delta$ -tocopherol as I.S.)	RP (Novapak C <sub>18</sub> ) HPLC–FL	Methanol	$\delta$ -Tocopherol as I.S.	[49]
Mice brain, heart, kidney, liver and skin	$\gamma$ -Tocopherol, $\alpha$ -, and $\gamma$ -tocotrienol, ubiquinol-9 and -10, ubiquinone-9 and -10	Skin: homogenized in buffer (NaCl, EDTA, Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (BHT), SDS added, ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation.  Other tissues: homogenate with SDS, ethanol precipitation, heptane extraction	RP (Ultrasphere ODS), HPLC–UV–ED	Gradient: (A) Methanol–water (80:20), 0.2% LiClO <sub>4</sub>  (B) Ethanol, 0.2% LiClO <sub>4</sub>	LOD: 0.1 pmol	[35]
Human plasma, erythrocyte membranes	$\alpha$ -Tocopherol quinone, ( $\gamma$ + $\beta$ )- $\delta$ -tocopherol	Reaction with sodium hydrogensulphite, ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (MC MEDICAL C <sub>18</sub> ), HPLC–ED	Methanol water (96:4), 40 mM NaClO <sub>4</sub>	LOD: 50 pg, recovery=98.3±1.2% (plasma), 91.5±2.85 (erythrocyte membrane)	[108]
Human plasma	Retinol, all- <i>trans</i> - $\alpha$ -carotene, all- <i>trans</i> - $\beta$ -carotene, 9-, 13- and 15- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	Ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation, redissolve in ethanol (tocopherol acetate as 2 <sup>nd</sup> I.S.)	RP (Suplex pKb-100) HPLC–UV	Methanol methyl <i>tert</i> -butyl ether–water	Retinol acetate as I.S.	[110]
Piglets heart and liver	$\beta$ -, $\gamma$ - and $\delta$ -tocopherol, $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - and $\delta$ -tocotrienol	Ethanol precipitation, sonication, hexane extraction–evaporation	NP (Supelcosil LC-Diol), IDPLC–TL	Hexane–2-propanol (99:1)	Recovery >95%	[88]
Human plasma (preterm infants)	Retinol, $\gamma$ - and $\delta$ -tocopherol	Ethanol precipitation (BHT), hexane (BHT) extraction–evaporation	RP (LiChrospher 100, RP <sub>18</sub> ) HPLC–UV	Acetonitrile–THF–methanol–ammonium acetate 1% (68.4:22.6:8:2.8)	LOQ=2,370 $\mu$ M, Tocol as I.S. but only for chromatography.  Recovery: 96±7%	[50]
Serum	Retinol, lutein, zeaxanthin, canthaxanthin, $\beta$ -cryptoxanthin, lycopenes, $\alpha$ - and $\beta$ -carotene (9 more carotenoids and $\gamma$ -tocopherol separated but not identified–quantitated)	Water–ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (Adsorbosphere C <sub>18</sub> , two columns in serie), HPLC–UV	Gradient: (A) Acetonitrile–methanol (60:40), 0.05% acetic acid  (B) Acetonitrile–methanol–dichloromethane (45.6:30.4:24), 0.04%	Tocol and echinenone as internal standard. Recoveries >92%, LOQ: 2 ng.	[111]

Table 6. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Human platelets, culture endothelial cells		Methanol–chloroform extraction–evaporation. TLC with chloroform–methanol–water–triethylamine (35:30:7:35) (ascorbic and BHT). Spot $R_f$ =0.86–0.89 to silica gel G60 column, hexane <i>tert</i> -butyl methyl ether (92.5:7.5) elution–evaporation.	RP (LiChrosorb RP <sub>18</sub> ). TPLC–FL or UV or light-scattering detection	Methanol–water (98:2)	$\alpha$ -Tocopherol acetate or $\delta$ -tocopherol as I.S. Objective of sample preparation: from the same sample obtain three extracts to measure cholesterol, tocopherol and phospholipid fatty acids	[54]
Rat liver, placenta, brain	Retinol, Retinol palmitate	Hexane extraction by sonication, evaporation	RP (Nucleosil C <sub>18</sub> ). HPLC–UV–FL	Methanol–water (96.5:3.5)	Vitamin K <sub>1</sub> as I.S.	[58]
Human plasma	Retinol, lycopene, lutein, $\alpha$ - and $\beta$ -carotene	Ethanol precipitation (ascorbic), hexane extraction–evaporation	RP (Nucleosil ODS). HPLC–UV	Methanol–acetonitrile–THF (75:20:5), 0.01% ascorbic acid	$\alpha$ -Tocopherol acetate and retinol acetate as I.S. Echinonone for carotenoids, but “not commercially available”. Recovery=96%, LOD=2.5 $\mu$ M	[120]
Rat liver, liposome suspension	$\alpha$ -Tocopherol hydroquinone, $\alpha$ -tocopherol quinone, $\gamma$ -tocopherol, $\alpha$ - and $\beta$ -tocotrienol, ubiquinol-9 and -10, ubiquinone-9 and -10	NaCl, SDS, ethanol (BHT) precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (LiChrosorb RP <sub>18</sub> ). HPLC Zn post column reduction EID	Methanol–water (98:2), 5 mM ZnCl <sub>2</sub> , 2.5 mM sodium acetate, 2.5 mM acetic acid.	Recovery >95%, LOD=0.3 pmol	[36]
Rat adipose tissue and mammary gland		Homogenize in ethanol–water, hexane extraction–evaporation	RP (Nucleosil C <sub>18</sub> ). HPLC–FL	Methanol–water (96.5:3.5)	Recovery >95%, Vitamin K <sub>1</sub> as I.S.	[30]
Rat liver, cell culture	$\alpha$ -Tocopherol oxybutiric acid	Homogenize in SDS (ascorbic acid) and ethanol with sonication. Hexane extraction–evaporation	RP (Spherisorb C <sub>18</sub> ). HPLC–FL	Methanol 96%	$\delta$ -Tocopherol as I.S. LOD: 3 pmol	[37]
Human serum (newborns)	Retinol	Ethanol precipitation, hexane extraction–evaporation	RP (NovaPak C <sub>18</sub> ). HPLC–FL–UV	Methanol–water (95:5)	Retinol acetate and $\alpha$ -tocopherol acetate as I.S. LOQ=11.6 $\mu$ M. Recovery=103%	[109]
Human serum and liver, rat serum, liver, intestines, spleen, brain, heart, skeletal muscle, kidney and lung	Retinol and 11 retinoids, $\gamma$ -tocopherol, lycopene, $\beta$ -carotene	2-Propanol dichloromethane (2:1) (BHT) precipitation–extraction (+acetic acid)	RP (Microsorb-MV). HPLC–UV	Gradient: (A) Methanol:water (3:1), 10 mM ammonium acetate; (B) Methanol–dichloromethane (4:1)	Retinol acetate as I.S.	[38]

Table 6. Continued

Source	Other analytes	Sample treatment	Technique/ detection	Conditions	Comments	Ref.
Mice brain, heart, kidney, liver, skin	$\gamma$ -Tocopherol, $\alpha$ - and $\gamma$ -tocotrienol, ubiquinol-9 and -10, ubiquinone-9 and -10	Homogenize in buffer (phosphate-buffered saline) (BHT), SDS added, ethanol precipitation, hexane extraction- evaporation	RP (Ultrasphere C <sub>18</sub> ), HPLC-UV-ED	Gradient: (A) Methanol-water (80:20), 0.2% LiClO <sub>4</sub>  (B) Ethanol, 0.2% LiClO <sub>4</sub>	Recoveries >90%, LOD 0.1 pmol	[51]
Plasma or serum	12 carotenoids, ( $\gamma$ + $\beta$ )-tocopherol	Water dilution, ethanol precipitation, hexane extraction- evaporation	RP (Primesphere C <sub>18</sub> ), HPLC-UV-TL	Acetonitrile-THF-methanol-1% ammonium acetate (68.4:22.0:6.8:2.8)	LOD=20 $\mu$ g/l	[161]
Human serum	Retinol, $\gamma$ -tocopherol	Ethanol precipitation, Butanol-ethyl acetate (1:1) extraction, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> dried.	RP (Supelcosil LC-18), HPLC-TL	Program: 90–100% A  (A) Acetonitrile-butanol (95:5) (B) Water	$\alpha$ -Tocopherol acetate as I.S.  LOD=0.35 $\mu$ M  Recovery=97%	[67]
Human stratum corneum	Cholesterol	Ethanol/SDS (BHT) homogenize, hexane extraction- evaporation	RP (Ultrasphere ODS), HPLC-ED	Methanol-ethanol (1:9), 20 mM LiClO <sub>4</sub>		[39]
Human plasma		Acetonitrile-THF (3:2) precipitation- extraction	RP (Crestpak C <sub>18</sub> ), HPLC-UV	Methanol (6% THF)	Recovery 81–97% (low concentrations give poor recoveries)	[66]
Human plasma	Retinol, $\beta$ -carotene	Ethanol-water (2:1) precipitation, hexane (BHT) extraction- evaporation	RP (LiChrospher RP <sub>18</sub> ), HPLC-UV	Acetonitrile-THF-methanol-1% ammonium acetate (68.4:22.0:6.8:2.8)	LOD: 0.7 $\mu$ M, recovery=97%	[52]
Rat plasma, heart, lung, liver, kidney	$\alpha$ -Tocopherol, quinone, ( $\beta$ + $\gamma$ )-tocopherol	Homogenize in Tris buffer (tissues), ethanol precipitation (BHT, ascorbic acid, pyrogallol), Saponification, hexane-ethyl acetate (9:1) extraction- evaporation	RP (Neo-pack ODS), HPLC-ED	Methanol 95%, 50 mM Na ClO <sub>4</sub>	Recovery=86%, LOD=0.25 pmol	[46]

used by Liebler and coworkers for determination of vitamin E and its oxidation products [33,82].

### 5. High performance liquid chromatography

HPLC separations of tocopherols provides a fast, simple, sensitive, selective and more robust technique than GC [83]. HPLC separations of toco-

pherols are performed on both normal- and reversed-phase columns.

### 6. Normal-phase high-performance liquid chromatography

Normal-phase systems show elution of homologues in order of increasing polarity with separation

based on methyl substituents on the chromanol moiety. The normal-phase columns provide separation of all isomers, while  $\beta$  and  $\gamma$ -tocopherols are not easily separated in conventional reversed-phase columns. Besides their ability to separate  $\beta$ - and  $\gamma$ -isomers, normal-phase separations present also the advantages of operating with organic solvents allowing a high solubility for lipids and of tolerating high loads of lipids which are easy to wash-out by non-polar solvents. Normal-phase HPLC is very suitable for the direct analysis of oils and fats.

Silica columns with binary isocratic or gradient mobile phases of hexane–2-propanol have been widely applied [2,72,84–93]. Abidi and Mounts [94] studied and interpreted resolution provided by aminopropylsilica and diol-bonded silica with binary solvent systems comprising a hydrocarbon and an alcohol, an ether or an ester. Recently six silica, three amino and one diol columns were tested for the separation of vitamin E compounds in a prepared mixture containing oat extracts and palm oil as matrix [83]. The best separation were obtained on three silica columns and two amino columns using 5% dioxane in hexane as mobile phase, as well as on a diol column using 4% *tert*-butyl methyl ether in hexane as mobile phase. Anyway, poor reproducibility, prolonged equilibration times, low stability and the employment of hazardous volatile organic solvents have long been discussed. For  $\alpha$ -tocopherol analysis in plasma and tissues, normal-phase has fallen in disuse, because most of the times, data about other tocopherols are not relevant, and simplicity is a goal for reversed-phase HPLC. Nevertheless, normal-phase HPLC is still successfully used [88,95,96].

### 7. Reversed-phase high-performance liquid chromatography

Reversed-phase systems show separation based on the saturation of the phytol side chain. The more saturated isomers are retained longer.  $C_{18}$  reversed-phase systems do not completely resolve  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherols, which may however be separated by a polymeric column [97], nowadays commercially available. Nevertheless, when  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherols separation is not a critical point,  $C_{18}$  reversed-phase

systems are preferred, because equilibration times are shorter, and better reproducibility is achieved. Isocratically methanol with small amounts of water or other solvents is the most frequently employed mobile phase [34,36,37,43,49,54,57,58,66,68,74,75,77,98–109], and is enough for tocopherol quantification. If other analytes are to be measured, more complicated mobile phases, gradients, etc., need to be developed [35,38,48,51,110,111]. Moreover, if electrochemical detector is used, mobile phase must be modified with an electrolyte, usually perchlorate salts [35,39,46,61,107,108,112–114]. Zinc chloride has also been used in methods that reduce analytes after separation, before detection in oxidative mode [36].

Due to the fact that reference materials with certified reference values for the analyte of interest are not commercially available, results of two isocratic reversed-phase separation were tested by method comparison for serum samples versus an isotope dilution–gas chromatography–mass spectrometry (ID–GC–MS) method [81]. It was made to access the inaccuracy of the HPLC methods. Both HPLC methods were evaluated as precise and accurate enough for clinical use.

### 8. Internal standard

Recoveries can be a major problem in vitamin E analysis. Internal standards are desirable when analyte loss can occur during sample preparation steps prior to analysis. If a known quantity of standard is added to the unknown prior to any manipulations, the ratio of standard to analyte remains constant because the same fraction of each is lost in any operation. Chemical and physical properties of analyte and internal standard must be as similar as possible to come true this affirmation. 5,7-Dimethyltolcol [73,88,94,115], and tocol are among the employed internal standards that better fulfil these characteristics. Tocol (the desmethylated-chromanol form of tocopherols) is one of the internal standards most used, historically, but currently is not easily found in commercial brands [88,116], and only as a generous gift or synthesized in the same laboratory [117] is currently used.

$\beta$ -Tocopherol [118],  $\delta$ -tocopherol [38,49,54,61]

and  $\gamma$ -tocotrienol [113,114] have been used as internal standards, though they can be present in some samples.  $\alpha$ -Tocopherol acetate widely used [53,54,67,100,100,109,119,120] is a non-natural form of vitamin E, but can be present in manipulated oils and foods, in pharmaceutical formulae, and in tissues of people receiving parenteral or intravenous  $\alpha$ -tocopherol acetate as part of diet or medical treatment, and therefore precautions must be taken prior to its use to confirm its absence. Moreover, it has no electrochemical or fluorescent properties.

There are other compounds, described in Tables 1–6, employed as internal standards when other analytes are quantified, because internal standard with similar properties to all the analytes must be chosen, and many times interferences coming from the matrices make the election difficult. Franke et al. have reported a list of synthetic carotenoids (and the way to synthesize them) for plasma micronutrient analysis [121].

## 9. Detection

The four usual HPLC detection methods: Electrochemical detection (ED), fluorescence (FL), UV absorbance detection and light-scattering detection have been employed for determining tocopherols and related substances with sensitivities decreasing in the mentioned order.

HPLC–ED is the most sensitive and specific detection method of tocopherols by virtue of their low oxidative potentials. Moreover, as the process is reversible, oxidation products can also be measured, which is very interesting when studying tocopherols role in oxidative stress [13,16] Quinones do not fluoresce, therefore oxidation products cannot be determined with this detection method and UV detection has not enough sensitivity in some cases. Both amperometric [35,51,107] and coulometric [47,61,107,108,113,114] detection have been employed. ED is most suitable for RP-HPLC because the electrolytes needed are miscible with aqueous mobile phases.

ED as compared with FL leads to a 10-fold loss in sensitivity, but it depends on the composition of the mobile phase, which greatly affects both fluorescence yield and conductivity in ED. Nevertheless FL

is the top choice for many researchers because it is easier to operate than ED and compatible with normal-phase mobile phases. Both detection methods permit the employment of smaller sample amounts when it is important.

HPLC–UV poses a loss in sensitivity of around  $10^3$ -fold, but UV is the most common detection method and its sensitivity is enough in many cases for  $\alpha$ -tocopherol measurement. Moreover, in the diode array mode it permits to obtain the spectrum and it is a way of peak identification and purity test.

Evaporative light-scattering detection, widely used in lipid analysis due to the ability to detect compounds with or without chromophore, shows poor sensitivity and selectivity.

Coupling HPLC or GC with mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (NMR) also provides a powerful means for structural elucidation [122]. Nonpolar substances cannot easily be ionized by standard electrospray ionization (ESI). The ionization of carotenoids and tocopherols can be greatly enhanced by the addition of silver ions, the procedure has been named coordination ion spray (CIS) [123].

## 10. Other methods

In spite of the immense analytical potential of capillary electrochromatography, no reference have been found showing a good resolution for tocopherols, although Abidi [6] remarks that they are working in it with preliminary good results. Two enantiomers and two structural isomers of synthetic tocopherol have been separated by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [124], nevertheless, sensitivity will be always poorer than in HPLC because of the smaller amount of sample injected.

Supercritical fluid extraction (SFE) and chromatography (SFC) are ideally suited for medium to non polar labile compounds analysis and several works have been published with one of them or both techniques. Nevertheless, nowadays SFE has progressed rapidly and many applications have continued arising, but SFC has not followed the prospective rhythm, probably due to the complexity and cost of the instrumental system. Yarita et al. used a laboratory-built SFC system for the determination of

tocopherols [116], whereas capillary SFC coupled to MS has been used for the determination of the four tocopherols and other fat-soluble vitamins [125,126]. Recently, Buskov et al. [127] have developed a method for the determination of  $\alpha$ -tocopherol acetate,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol by packed column SFC using UV detection. The method has been applied to the determination of tocopherols in plant oils extracted by SFE.

Chiral separations of tocopherols and tocotrienols provide pure individual stereoisomers for nutrition, metabolism and pharmaceutical studies [32,45]. Several reports suggest differences among the bioavailability and biopotency of  $\alpha$ -tocopherol isomers [128,129] and the relevance of the configuration of the  $\alpha$ -tocopherol molecule on biodiscrimination is under study.

In 1990, Vecchi et al. reported a separation method of all-*rac*- $\alpha$ -tocopheryl acetate isomers combining HPLC and capillary GC [130]. With this method, the eight stereoisomers were separated into two groups of 2R and 2S-configurations by HPLC, and each of the groups was determined by GC. Subsequently, these time-consuming procedures were improved and simplified by omitting the acetylation of  $\alpha$ -tocopherol and by applying a commercially available HPLC chiral phase [32]. The new method consisted of extraction of  $\alpha$ -tocopherol from biological samples, purification by semipreparative HPLC, conversion to  $\alpha$ -tocopherol methylesters, separation by HPLC into five peaks and GC analysis of one of the peaks formed by four isomers.

Ueda et al. [45] developed a chiral HPLC method to separate the eight stereoisomers of unlabelled  $\alpha$ -tocopheryl acetate into four peaks. The first peak consisted of RRR, RRS, RSS and RSR; the second peak consisted of SSS and SSR; the third peak was SRR and the fourth peak was SRS. Afterwards, the method was newly revised and applied [129]. During sample treatment plasma and lipoprotein samples were acetylated because the analysed standards are in that form.

Between other methods it is interesting to quote a spectrophotometric method [131] newly published that permits simultaneous determination of total antioxidant activity in plant extracts based in phosphomolybdenum complex formation. The phosphomolybdenum method, in combination with hex-

ane monophasic extraction, has also been adapted for the specific determination of vitamin E in seeds. Other works related to  $\alpha$ -tocopherol analysis [132–161] have been included in Tables 1–4 and they do not deserve further comments than those included in the tables.

Finally, it is interesting to mention that in the USA there is a Micronutrients Measurement Quality Assurance Program for these analytes run by the National Institute of Standards and Technology (NIST) and in the UK an equivalent scheme is run. With these programs the quality of tocopherol measurement in the laboratory can be evaluated.

As general comments we could say that GC–MS is the selected tool for tocopherol metabolites identification and quantification, but GC is not adequate for routine tocopherol analysis mainly due to sample pre-treatment, which requires more steps than other methods. Normal-phase HPLC is the selected tool for fat matrices and when  $\beta$  and  $\gamma$  isomers need to be separated. The more general technique is reversed-phase HPLC, which nowadays resolves most of the analytical problems related to tocopherols analysis in a more rapid and simple way. Supercritical fluids are mainly applied to clean fractionated extractions from foods, while SFC is not a generally available tool. Finally, developing techniques, such as capillary electrophoresis, need further development in this area to be able of competing with established techniques.

## References

- [1] C. Bourgeois, Determination of Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols, Elsevier, New York, 1992.
- [2] G.W.J. Chase, A.R. Long, R.R. Eitenmiller, J. AOAC Int. 81 (1998) 577.
- [3] A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, M.G.M. DeRuyter, Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins, Marcel Dekker, New York, 1985.
- [4] J.K. Lang, M. Schillaci, B. Irvin, Modern chromatographic analysis of vitamins 2, in: A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, H.J. Nelis (Eds.), Chromatographic Science Series, Vol. 60, Marcel Dekker, New York, 1992.
- [5] L.J. Machlin, Handbook of Vitamins: Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects, Marcel Dekker, New York, 1984.
- [6] S.L. Abidi, J. Chromatogr. A 881 (2000) 197.
- [7] J. Davidck, J. Velisek, J. Micronutr. Anal. 2 (1986) 81.
- [8] A.P. De Leenheer, H.J. Nelis, W.E. Lambert, R.M. Bauwens, J. Chromatogr. 429 (1988) 3.

- [9] D. Schulze-Siebert, U. Homeyer, J. Soll, G. Schultz, P.K. Stumpf, J.B. Mudd, W.D. Nes, Seventh International Symposium on Plant Lipids, University of California, Davies, CA, Plenum Press, New York.
- [10] G.W. Burton, A. Joyce, K.U. Ingold, *Arch. Biochem. Biophys.* 221 (1983) 281.
- [11] K.U. Ingold, G.W. Burton, D.O. Foster, L. Hughes, D.A. Lindsay, A. Webb, *Lipids* 22 (1987) 163.
- [12] E. Herrera, *Nutr. Obes.* 3 (2000) 4.
- [13] R. Brigelius-Flohe, M.G. Traber, *FASEB J.* 13 (1999) 1145.
- [14] M.G. Traber, L. Packer, *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (1995) 1501S.
- [15] D.C. Liebler, *Subcell. Biochem.* 30 (1998) 301.
- [16] D.C. Liebler, *Crit. Rev. Toxicol.* 23 (1993) 147.
- [17] D. Siegel, E.M. Bolton, J.A. Burr, D.C. Liebler, D. Ross, *Mol. Pharmacol.* 52 (1997) 300.
- [18] M. Averna, R.L. Seip, K. Mankowitz, G. Schonfeld, *J. Lipid Res.* 34 (1993) 1957.
- [19] M. Schultz, M. Leist, M. Petrzika, B. Gassmann, R. Brigelius-Flohe, *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (1995) 1527S.
- [20] W.J. Wechter, D. Kantoci, E.D.J. Murray, D.C. D'Amico, M.E. Jung, W.H. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 6002.
- [21] S. Chiku, K. Hamamura, T. Nakamura, *J. Lipid Res.* 25 (1984) 40.
- [22] E.J. Simon, C.S. Gross, A.T. Milhorat, *J. Biol. Chem.* 221 (1956) 797.
- [23] J.K. Lodge, M.G. Traber, A. Elsner, R. Brigelius-Flohe, *J. Lipid Res.* 41 (2000) 148.
- [24] Y. Sato, K. Itagihara, H. Arai, K. Inoue, *FEBS Lett.* 288 (1991) 41.
- [25] M. Arita, Y. Sato, A. Miyata, T. Tanabe, F. Takahashi, H.J. Kayden, H. Arai, K. Inoue, *Biochem. J.* 306 (Pt 2) (1995) 437.
- [26] A. Hosomi, M. Arita, Y. Sato, C. Kiyose, T. Ueda, O. Igarashi, H. Arai, K. Inoue, *FEBS Lett.* 409 (1997) 105.
- [27] N.C. Hoglen, S.C. Waller, I.G. Sipes, D.C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 401.
- [28] R.V. Cooney, A.A. Franke, P.J. Harwood, V. Hatch Pigott, L.J. Custer, L.J. Mordan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1771.
- [29] S. Christen, A.A. Woodall, M.K. Shigenaga, P.T. Southwell-Keeley, M.W. Duncan, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 3217.
- [30] F.J. Rupérez, C. Barbas, M. Castro, S. Martínez, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 483.
- [31] G.W. Burton, A. Webb, K.U. Ingold, *Lipids* 20 (1985) 29.
- [32] G. Riss, A.W. Kormann, E. Glinz, W. Walther, U.B. Ranaldler, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 302.
- [33] D.C. Liebler, J.A. Burr, L. Philips, A.J. Ham, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 27.
- [34] J.Z. Huo, H.J. Nelis, P. Lavens, P. Sorgeloos, A.P. De Leenheer, *Anal. Biochem.* 242 (1996) 123.
- [35] M. Podda, C. Weber, M.G. Traber, L. Packer, *J. Lipid Res.* 37 (1996) 893.
- [36] C. Leray, M.D. Andriamampandry, M. Freund, C. Gachet, J.P. Cazenave, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 2099.
- [37] M.A. Tirmenstein, B.W. Watson, N.C. Haar, M.W. Fariss, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 308.
- [38] A.B. Barua, J.A. Olson, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 69.
- [39] J.J. Thiele, L. Packer, *Methods Enzymol.* 300 (1999) 413.
- [40] F. Ueda, M. Watanabe, Y. Hirata, K. Kimura, *J. Pharmacol. Methods* 24 (1990) 277.
- [41] A.P. De Leenheer, V.O. De Bevere, M.G. De Ruyter, A.E. Claeys, *J. Chromatogr.* 162 (1979) 408.
- [42] E.J. Konings, H.H. Roomans, P.R. Beljaars, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 902.
- [43] S. Albala-Hurtado, S. Novella-Rodríguez, M.T. Veciana-Nogues, A. Marine-Font, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 243.
- [44] A. Pfalzgraf, H. Steinhart, M. Frigg, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200 (1995) 190.
- [45] T. Ueda, H. Ichikawa, O. Igarashi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Tokyo* 39 (1993) 207.
- [46] H. Kanazawa, C. Miyata, Y. Nagata, S. Urano, Y. Matshushima, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000) 1462.
- [47] G.T. Vatassery, W.E. Smith, H.T. Quach, *Anal. Biochem.* 214 (1993) 426.
- [48] T. Van Vliet, F. Van Schaik, J. Van Schoonhoven, J. Schrijver, *J. Chromatogr.* 553 (1991) 179.
- [49] E. Teissier, E. Walters Laporte, C. Duhem, G. Luc, J.C. Fruchart, P. Duriez, *Clin. Chem.* 42 (1996) 430.
- [50] Y. Gobel, C. Schaffer, B. Koletzko, *J. Chromatogr. B* 688 (1997) 57.
- [51] M. Podda, C. Weber, M.G. Traber, R. Milbradt, L. Packer, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 330.
- [52] J.G. Erhardt, F. Heinrich, H.K. Biesalski, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69 (1999) 309.
- [53] M.J. Gonzalez-Corbella, N. Lloberas-Blanch, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. Lopez-Sabater, M. Rivero-Urgell, *J. Chromatogr. B* 660 (1994) 395.
- [54] C. Leray, M. Andriamampandry, G. Gutbier, J. Cavadeni, C. Klein-Soyer, C. Gachet, J.P. Cazenave, *J. Chromatogr. B* 696 (1997) 33.
- [55] Q. Su, K.G. Rowley, K. O'Dea, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 191.
- [56] M. Viana, C. Barbas, B. Bonet, M.V. Bonet, M. Castro, M.V. Fraile, E. Herrera, *Atherosclerosis* 123 (1996) 83.
- [57] F.J. Rupérez, C. Barbas, M. Castro, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 93.
- [58] C. Barbas, M. Castro, B. Bonet, M. Viana, E. Herrera, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 415.
- [59] T. Kondo, J. Gamson, J.B. Mitchell, P. Riesz, *Int. J. Radiat. Biol.* 54 (1988) 955.
- [60] B.J. Zaspel, A.S. Csallany, *Anal. Biochem.* 130 (1983) 146.
- [61] C. Sarzanini, E. Mentasti, M. Vincenti, M. Nerva, F. Gaido, *J. Chromatogr.* 620 (1993) 268.
- [62] P.O. Edlund, *J. Chromatogr.* 425 (1988) 87.
- [63] H.R. Patel, S.P. Ashmore, L. Barrow, M.S. Tanner, *J. Chromatogr.* 495 (1989) 269.
- [64] N.D. Mostow, R. O'Neill, D.L. Noon, B.R. Bacon, *J. Chromatogr.* 344 (1985) 137.
- [65] J. Torre, M.P. Lorenzo, M.P. Martínez-Alcázar, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 305.
- [66] T. Julianto, K.H. Yuen, A.M. Noor, *J. Chromatogr. B* 732 (1999) 227.
- [67] A. Sobczak, B. Skop, B. Kula, *J. Chromatogr. B* 730 (1999) 265.



- [68] H. Qian, M. Sheng, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 127.
- [69] Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th edition, AOAC International, Arlington, VA, 1995.
- [70] N.U. Perisic-Janjic, B. Vujicic, *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 10 (1997) 447.
- [71] S. Stangler, D.B. Voncina and D. Dobcnik, *Zb. Ref. Posvetovanja Slov. Kem. Dnevi*, in: Glavic, Peter; Brodnjak-Voncina, Darinka (Eds), *Fakulteta Za Kemijo in Kemijsko Tehnologijo Univerze v Mariboru, Maribor, Slovenia (Slovenian)*, 1999, pp. 756–761.
- [72] G.W.J. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 107.
- [73] M. Lechner, B. Reiter, E. Lorbeer, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 231.
- [74] J.S. Bonvehi, F.V. Coll, I.A. Rius, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 627.
- [75] S. Scalia, G. Ruberto, F. Bonina, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 433.
- [76] E. Ibáñez, J. Palacios, F.J. Señoráns, G. Santa-María, J. Tabera, G. Reglero, *J. AOAC Int.* 77 (2000) 187.
- [77] C. Turner, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 275.
- [78] J. Lehman, H.T. Slover, *Lipids* 11 (1976) 853.
- [79] H.G. Lovelady, *J. Chromatogr.* 78 (1973) 449.
- [80] H.U. Melchert, E. Pabel, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 209.
- [81] R. Kock, S. Seitz, B. Delvoux, H. Greiling, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 35 (1997) 371.
- [82] D.C. Liebier, J.A. Burr, A.J. Ham, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 309.
- [83] A. Kamal-Eldin, R. Andersson, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 375.
- [84] G.W.J. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 271.
- [85] E. Psomiadou, M. Tsimidou, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 5132.
- [86] L. Ye, J.L. Landen Jr., R.R. Eitenmiller, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 21 (1998) 1227.
- [87] H.F. Indyk, *Analyst* 113 (1988) 1217.
- [88] J.K. Kramer, L. Blais, R.C. Fouchard, R.A. Melnyk, K.M. Kallury, *Lipids* 32 (1997) 323.
- [89] H.E. Indyk, *Analyst* 115 (1990) 1525.
- [90] V. Lagouri, D. Boskou, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47 (1996) 493.
- [91] T. Xue, V. Piironen, H. Hartikainen, *Agrobiol. Res.* 50 (1997) 265.
- [92] C.L. Emmons, D.M. Peterson, G.L. Paul, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4894.
- [93] A.A. Qureshi, H. Mo, L. Packer, D.M. Peterson, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3130.
- [94] S.L. Abidi, T.L. Mounts, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19 (1996) 509.
- [95] R. Rettenmaier, W. Schuep, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 62 (1992) 312.
- [96] W. Schuep, R. Rettenmaier, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 294.
- [97] S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert, *Anal. Chem.* 70 (1998) 13.
- [98] J. Vigo, M.J. Lucero, M.J. Leon, *Boll. Chim. Farm.* 131 (1992) 415.
- [99] S.L. Riehmer, M.C. Kent, M.W. Bernart, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 75.
- [100] E. Gimeno, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventós, M.C. de la Torre, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 251.
- [101] J.I. Rader, C.M. Weaver, L. Patrascu, L.H. Ali, G. Angyal, *Food Chem.* 58 (1997) 373.
- [102] L. Gamiz-Gracia, A. Velasco-Arjona, M.D. Luque de Castro, *Analyst* 124 (1999) 801.
- [103] P. Manzi, G. Panfili, L. Pizzoferrato, *Chromatographia* 43 (1996) 89.
- [104] J.Z. Huo, H.J. Nelis, P. Lavens, P. Sorgeloos, A.P. De Leenheer, *J. Chromatogr. B* 724 (1999) 249.
- [105] M.A. Murcia, A. Vera, F. García-Carmona, *J. Sci. Food Agric.* 60 (1992) 81.
- [106] J.M. DeLong, K.L. Steffen, *Can. J. Plant Sci.* 77 (1997) 453.
- [107] P.A. Motchnik, B. Frei, B.N. Ames, *Methods Enzymol.* 234 (1994) 269.
- [108] H. Takada, T. Shibuya, K. Yanagawa, H. Kanoh, M. Takasaki, *J. Chromatogr. A* 722 (1996) 287.
- [109] A.R. Weinmann, M.S. Oliveira, S.M. Jorge, A.R. Martins, *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 231.
- [110] J.R. Tane, T.W. Webb, R.V. Acuff, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 111.
- [111] J.P. Steghens, A.L. van Kappel, E. Riboli, C. Collombel, *J. Chromatogr. B* 694 (1997) 71.
- [112] H. Wakabayashi, S. Yamato, M. Nakajima, K. Shimada, *Biol. Pharm. Bull.* 17 (1994) 997.
- [113] B. Finckh, A. Kontush, J. Commentz, C. Hubner, M. Burdelski, A. Kohlschutter, *Anal. Biochem.* 232 (1995) 210.
- [114] B. Finckh, A. Kontush, J. Commentz, C. Hubner, M. Burdelski, A. Kohlschutter, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 341.
- [115] S.X. Li, G. Cherian, D.U. Ahn, R.T. Hardin, J.S. Sim, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3830.
- [116] T. Yaritha, A. Nomura, K. Abe, Y. Takeshita, *J. Chromatogr. A* 679 (1994) 329.
- [117] A. Bortolotti, G. Lucchini, M.M. Barzago, F. Stellari, M. Bonati, *J. Chromatogr.* 617 (1993) 313.
- [118] F.D. Goffman, I. Velasco, W. Thies, *Fett/Lipid* 101 (1999) 142.
- [119] J.F. Mallet, C. Cerrati, E. Ucciani, J. Gamisans, M. Gruber, *Food Chem.* 49 (1994) 61.
- [120] D. Talwar, T.K. Ha, J. Cooney, C. Brownlee, D.S. O'Reilly, *Clin. Chim. Acta* 270 (1998) 85.
- [121] A.A. Franke, L.J. Custer, R.V. Cooney, *J. Chromatogr.* 614 (1993) 43.
- [122] S. Strohschein, C. Rentel, T. Lackner, E. Bayer, A. Klaus, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1780.
- [123] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4394.
- [124] J. Zhao, G. Yang, H. Duan, J. Li, *Electrophoresis* 22 (2001) 151.
- [125] J.M. Snyder, S.L. Taylor, J.W. King, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70 (1993) 349.

- [126] P. Manninen, P. Laakso, H. Kallio, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1001.
- [127] S. Buskov, S.S. Jorgensen, H. Sorensen, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 49 (8) (1999) 135.
- [128] H. Weiser, G. Riss, A.W. Kormann, *J. Nutr.* 126 (1996) 2539.
- [129] C. Kiyose, R. Muramatsu, Y. Kameyama, T. Ueda, O. Igarashi, *Am. J. Clin. Nutr.* 65 (1997) 785.
- [130] M. Vecchi, W. Walther, E.N.E. Glinz, R. Schmid, M. Lalonde, W. Vetter, *Helv. Chim. Acta* 73 (1990) 782.
- [131] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, *Anal. Biochem.* 269 (1999) 337.
- [132] J. Sun, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 68.
- [133] M.P. Labadie, C.E. Boufford, *J. AOAC* 71 (1988) 1168.
- [134] A. Gapor, A. Kato, A.S.H. Ong, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63 (1986) 330.
- [135] S.L. Abidi, T.L. Mounts, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 67.
- [136] C.G. Rammell, J.J.L. Hoogenboom, *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 707.
- [137] J. Parcerisa, I. Casals, J. Boatella, R. Codony, M. Rafecas, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 149.
- [138] A. Sánchez-Pérez, M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 229.
- [139] A. Staby, C. Borch-Jensen, S. Balchen, J. Mollerup, *Chromatographia* 39 (1994) 697.
- [140] K.E. Sharpless, M. Arce-Osuna, J.B. Thomas, L.M. Gill, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 288.
- [141] G. Panfili, P. Manzi, L. Pizzoferrato, *Analyst* 119 (1994) 1161.
- [142] C.J. Hogarty, C. Ang, R.R. Eitenmiller, *J. Food. Compos. Anal.* 2 (1989) 200.
- [143] S. Dial, R.R. Eitenmiller, A.S.H. Ong, E. Niki, L. Packer (Eds.), UNESCO Conference, American Oil Chemists' Society Press, Champaign, IL, 1995.
- [144] Analytical Methods Committee, *Analyst* 116 (1991) 421.
- [145] L.G. Rushing, W.M. Cooper, H.C. Thompson Jr., *J. Agr. Food Chem.* 39 (1991).
- [146] T.-S. Shin, J.S. Godber, *J. Chromatogr. A* 678 (1994) 49.
- [147] A.C. Kurilich, J.A. Juvik, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1948.
- [148] F.D. Goffman, L. Velasco, H.C. Becker, *Fett/Lipid* 101 (1999) 400.
- [149] K. Schwarz, W. Ternes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 (1992) 95.
- [150] M. Murkovic, A. Hillebrand, J. Winkler, E. Leitner, W. Pfannhauser, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 203 (1996) 216.
- [151] M. Murkovic, A. Hillebrand, S. Draxl, J. Winkler, W. Pfannhauser, *Acta Hort.* 492 (1999) 47.
- [152] L.J. Jakovljevic, Z. Basic, M. Salvic, M. Kis, *Curr. Status Future Trends Anal. Food Chem. Proc. Eur. Conf. Food Chem., 8<sup>th</sup>, Austrian Chemical Society, Vienna, Austria, 1995, 2, 395–397.*
- [153] J. Molina-Torres, M.I. Martínez, *New Phytol.* 118 (1991) 95.
- [154] J. Leipner, Y. Fracheboud, P. Stamp, *Env. Exp. Bot.* 42 (1999) 129.
- [155] J.I. Garcia-Plazaola, J.M. Becerril, *Phytochem. Anal.* 10 (6) (1999) 307–313.
- [156] R. Sridhar, G. Lakshminarayana, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 61.
- [157] S. Munné-Bosch, K. Schwarz, L. Alegre, *Z. Naturforsch.* 54 (1999) 698.
- [158] S. Munné-Bosch, K. Schwarz, L. Alegre, *Plant Physiol.* 121 (1999) 1047.
- [159] K. Seta, H. Nakamura, T. Okuyama, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 585.
- [160] D.W. Nierenberg, S.L. Nann, *Am. J. Clin. Nutr.* 56 (1992) 417.
- [161] C.P. Aebischer, J. Schierle, W. Schuep, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 348.