

Efecto del Aceiterol[®], aceite de oliva virgen extra enriquecido con licopeno, sobre los niveles de colesterol total y estrés oxidativo en individuos con hipercolesterolemia.

Efecto del Aceiterol[®], aceite de oliva virgen extra enriquecido con licopeno, sobre los niveles de colesterol total y estrés oxidativo en individuos con hipercolesterolemia.

- Equipo de investigación.

Valencia

Victoria Valls Bellés

Pilar Codoñer Franch

Universidad de Valencia.

Madrid

Jesús Román Martínez Álvarez

Antonio Villarino Marín

Universidad Complutense de Madrid.

Efecto del Aceiterol[®], aceite de oliva virgen extra enriquecido con licopeno, sobre los niveles de colesterol total y estrés oxidativo en individuos con hipercolesterolemia.

Índice	pg.
I. Introducción	5
II. Hipótesis y objetivos	13
III. Material y métodos	13
IV. Resultados	22
V. Conclusiones	36
VI. Bibliografía	37

RESUMEN DEL PROYECTO. JUSTIFICACIÓN.

El estudio del efecto de alimentos naturales con compuestos bioactivos funcionales sobre la salud es en la actualidad uno de los campos de investigación más importante y atractivo, con un crecimiento exponencial sorprendente durante los últimos años. El licopeno, es un carotenoide presente en alimentos de origen vegetal con propiedades antioxidantes que aportan efectos beneficiosos en la regulación de los niveles de colesterol, y en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Por su naturaleza lipídica su biodisponibilidad y por lo tanto sus efectos in vivo, dependen de la cantidad de licopeno ingerida que se ve aumentada si se ingiere con ácidos grasos como los presentes en el aceite de oliva. Por otro lado, conocidos son los efectos saludables del aceite de oliva, tanto debido a la presencia de compuestos fenólicos, como por la presencia de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico.

Por todo esto, se propone estudiar el efecto del aceite de oliva enriquecido con licopeno sobre el metabolismo lipídico, y sobre los biomarcadores del daño oxidativo en una población de individuos con hipercolesterolemia. El objetivo es evaluar sus posibles efectos reguladores sobre el perfil lipídico en sangre, y sus efectos protectores sobre dianas de radicales libres reconocidos como biomarcadores de las enfermedades cardiovasculares.

PALABRAS CLAVE:

Licopeno, aceite de oliva, colesterol, daño oxidativo.

I. INTRODUCCIÓN.

El **licopeno** es un pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los tomates, sandías y en menor cantidad a otras frutas y verduras. Pertenece a la familia de los carotenoides como el betacaroteno, sustancias que no sintetiza el cuerpo humano sino los vegetales y algunos microorganismos, debiéndolo tomar en la alimentación como micronutrientes. Numerosos estudios científicos han puesto de manifiesto que el licopeno tiene propiedades antioxidantes.

La facilidad con la que incorporamos el licopeno a nuestro organismo, es decir, su biodisponibilidad, es diferente según la forma en que lo consumamos. Las investigaciones confirman que su absorción es mayor cuando se consume en forma de salsa confeccionada con una base grasa que cuando se hace en forma de fruta natural o zumo. Ello parece deberse a que el licopeno, por su liposolubilidad, se absorbe mejor en esta forma. El licopeno se encuentra presente en el organismo humano tanto en sangre en cantidad de 30 µg/dL como en tejidos con una distribución variable.

Se estima que el consumo no debe ser menor a 4 mg diarios y diversos estudios sugieren que debería estar situado entre los 5 y los 10 mg. Sin embargo, en la actualidad el consumo de alimentos con carotenoides es mucho menor. Esto ha llevado a la industria a obtener licopeno con un alto grado de pureza que puede ser añadido como ingrediente a diferentes alimentos y bebidas.

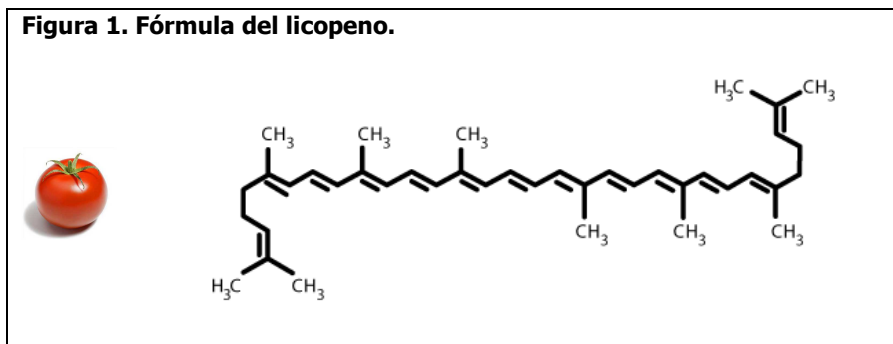
El **aceite de oliva virgen** es un alimento muy estudiado por sus propiedades preventivas frente a numerosas patologías. En efecto, numerosos trabajos se han desarrollado en los últimos años con el objetivo de conocer su papel en patologías cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer, sobre la funcionalidad del aparato digestivo, etc. Estos posibles efectos se deben primordialmente a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados -especialmente el ácido oleico- así como a la presencia de vitaminas A, D, K y E, ocupando un lugar destacado su contenido en tocoferoles y polifenoles, responsables de buena parte de su actividad antioxidante. En este sentido, cabe agregar que la vitamina E del aceite de oliva virgen se encuentra en forma de alfa-tocoferol y su actividad antioxidante es diez veces mayor que el gamma-tocoferol, forma natural de la vitamina E en otros aceites de semillas.

La Food and drug administration americana (FDA) estableció en 2004 que existía una evidencia, limitada y no concluyente, pero suficiente para sugerir que la ingestión de dos cucharadas diarias (23 gramos) de aceite de oliva podrían reducir el riesgo de enfermedad coronaria cardiaca debido a la presencia en el aceite de oliva de ácido oleico. Para obtener este beneficio, se señala que el aceite debe reemplazar en la dieta una cantidad similar de grasa saturada sin que resulten elevadas la calorías diarias totales ingeridas.

1. Licopeno.

El licopeno es el carotenoide más abundante en los tomates siendo el pigmento que les proporciona su típico color rojo. En los países occidentales, el 85% del licopeno e la dieta procede del tomate y de todos sus productos derivados (conservas, ketchup, etc.). A diferencia del caroteno, el licopeno no tiene en el organismo una actividad provitamínica aunque, como veremos, esto no implica que no presente diferentes actividades biológicas. En este sentido, es necesario recordar que el licopeno se convierte gracias a sus dobles enlaces (once de ellos no conjugados y dos conjugados) en una sustancia muy reactiva frente a las especies oxigénicas reactivas (Figura 1).

Figura 1. Fórmula del licopeno.



De hecho, recientemente numerosos estudios han sugerido que la ingestión de productos derivados del tomate pueden tener un efecto antioxidante, anticancerígeno y antitrombótico, al menos in vitro (Bessler et al., 2008; Erdman et al., 2008), dada precisamente esta elevada capacidad antioxidante, capacidad que, sin embargo, no ha sido plenamente confirmada mediante estudios in vivo (Erdman et al., 2008). Es necesario señalar como los distintos autores señalan cómo las concentraciones tisulares de licopeno son demasiado bajas como para poder explicar gracias a él su efecto teórico. Probablemente, serían sus metabolitos (licopenoides) los realmente responsables de buena parte de esta actividad biológica descrita (Mein et al., 2008).

Sin embargo, un dato que hay que tener en cuenta en lo relativo a las posibles declaraciones de salud para el tomate y el licopeno, es que la Food and drug administration americana (FDA) declaró en 2007 que la evidencia era muy limitada en lo que respectaba a la asociación entre su consumo y la reducción del riesgo de cáncer de próstata, de ovario, estómago y páncreas (Kavanaugh et al., 2007).

1.1 Disponibilidad del licopeno.

Una de las controversias habituales que rodea el mundo de los ingredientes funcionales es su biodisponibilidad, un fenómeno que resulta muy complejo y que depende de muchos factores. En este caso, existen numerosos estudios que prueban claramente la absorción del licopeno, tanto del contenido en el tomate como en sus productos derivados, absorción que podría llegar a ser del 91% al concluir el proceso digestivo para unos carotenoides concretos: el beta-caroteno, la luteína y el licopeno (Goñi et al., 2006), siendo decisivo en este proceso la fermentación colónica.

Así, en 2004, Riso proporcionó a diferentes sujetos una cantidad concreta de licopeno (8 mg diarios) a partir de diferentes productos derivados del tomate. Esta suplementación conllevó el incremento del contenido en licopeno del plasma y de los linfocitos (Riso et al., 2004). Esta absorción dosis - dependiente se ha comprobado no únicamente en el plasma sino también en fluidos corporales como el seminal (Goyal et al., 2007) y con una correlación bastante elevada ($r=0.84$). Ciertamente en otros estudios este aumento, que sería el reflejo de una buena absorción del licopeno en el intestino, no se produjo (Bugianesi et al., 2004). Según reflejan algunos estudios, la absorción del licopeno a partir de productos o platos cocinados-calentados mejora ostensiblemente. Es lo que comprobó Fielding al preparar en la cocina tomates junto con aceite de oliva (Fielding et al., 2005).

En cuanto a las diferentes formas químicas del licopeno, parece ser que las formas Z-isoméricas se producen en el interior del cuerpo humano tras la absorción del E-licopeno (Fröhlich et al., 2006), al menos tras ingerirse dosis de 12.5 mg durante 4 semanas. En efecto, el licopeno está presente en el organismo (plasma y tejidos) en su forma cis, mientras que en los productos derivados del tomate se encontraría preferentemente en su forma trans, lo cual conlleva la necesidad de que el cuerpo lo isomerice para que no

se reduzca esta biodisponibilidad (Unlu et al., 2007). De este modo, parece lógico que pudiéramos mejorar la absorción del licopeno a partir de productos ricos en sus formas cis (Burri et al., 2008), lo cual conlleva la necesidad de controlar adecuadamente los parámetros de fabricación de estos productos para aumentar de este modo la presencia de formas cis.

1.2 Seguridad.

No existen demasiados datos sobre la seguridad, dosis eficaz del licopeno y otros aspectos toxicológico - farmacológicos. Shao publicó que ingestiones de hasta 75 mg diarios de licopeno parecen ser seguros. Sin embargo, con cifras superiores no se han producido efectos perjudiciales, aunque lógicamente no es posible extraer conclusiones relativas a su seguridad a largo plazo (Shao y Hathcock, 2006). En dosis altas, habría que tener en cuenta otros posibles tóxicos hepáticos presentes en la dieta como el alcohol que, de alguna manera, parecen estar interrelacionados (Veeramachaneni et al., 2008).

1.3 El papel del licopeno como antioxidante.

Desde hace tiempo es conocida la capacidad antioxidante del licopeno reflejada en sucesos como la protección producida frente al daño al ADN derivado de la agresión por parte de especies oxigénicas reactivas (ROS). Esta acción, en cualquier caso, se explica también como consecuencia del efecto sinérgico ejercido por los diferentes antioxidantes presentes en los alimentos ricos en licopeno como sería el tomate (Riso et al., 2004), bien es cierto que dosis elevadas exclusivamente de un licopeno purificado (30 mg/diarios) han demostrado tener el mismo efecto protector sobre el ADN (Devaraj et al., 2008).

Esta capacidad antioxidante ha sido objeto de numerosos estudios que han reflejado su efecto sobre los biomarcadores de estrés oxidativo tanto en personas sanas como pacientes de diferentes patologías (cáncer, diabetes, etc.), insistiendo siempre en la sinergia entre todos los fitoquímicos que están presentes en los alimentos naturales (Basu y Imrhan, 2007; Jacob et al., 2008). Una idea de esta capacidad protectora frente a los radicales libres la puede proporcionar el trabajo de Srinivasan, quien muestra cómo la ingestión de licopeno previa a una irradiación ionizante puede proteger de su efecto deletéreo (Srinivasan et al., 2006). Asimismo, este papel antioxidante del licopeno se ve reforzado al conocer cómo los marcadores de estrés oxidativo, que habitualmente se incrementan tras una comida rica en grasa, se ven atenuados en sujetos sanos tras su ingestión (Denniss et al., 2008).

1.4 El licopeno en diferentes patologías.

Como hemos señalado con antelación, el licopeno se ha relacionado desde hace tiempo con el tratamiento y la prevención de diferentes patologías. Afortunadamente, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios que nos permiten conocer más a fondo estos posibles efectos, sus condiciones y realidad.

1.4.1 Cáncer. El licopeno se ha visto como potencialmente interesante en la prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer: de mama, de próstata (Salman et al., 2007) y de colon (Walfisch et al., 2007; Tang et al., 2008), tanto en estudios in vitro como observacionales (Seren et al., 2008; Huang et al., 2008; Burguess et al., 2008). Estos trabajos se han desarrollado en diferentes poblaciones: personas sanas, diabéticos y pacientes con cáncer prostático entre otros (Basu e Imrhan, 2006).

Sin embargo, esta premisa no ha sido confirmada hasta hoy de forma tajante tras realizar ensayos clínicos. Así, en el estudio dirigido por Sesso, que publicó en 2005, se estudiaron 39.876 mujeres y el contenido en licopeno de su dieta sin que se pudiera establecer conexión alguna entre las concentraciones plasmáticas de licopeno y un

menor riesgo de cáncer de mama, ni en mujeres de mediana edad ni en ancianas (Sesso et al. a), 2005). Su efecto y el de otros carotenoides tampoco se ha comprobado en cánceres como el de útero (Terry et al., 2008).

Uno de los posibles efectos fisiológicos del licopeno es su papel inhibitorio sobre los estrógenos. Diferentes carotenoides (licopeno, fitoeno, fitoflueno, betacaroteno) han demostrado inhibir la proliferación de células cancerosas que estaba inducida por la presencia de 17-beta-estradiol y de fitoestrógenos como la genisteína. En el caso del licopeno, la inhibición del crecimiento celular estaba acompañada del enlentecimiento del ciclo celular desde la fase G1 a la S (Hirsch et al., 2006), por lo que su papel teórico sería la atenuación de los efectos deletéreos de los estrógenos en cánceres hormono-dependientes.

Vrieling ha señalado que el licopeno podría estar involucrado en las tasas circulantes en plasma del factor I de crecimiento similar a la insulina IGF-1, el cual en concentraciones elevadas se relaciona con mayor riesgo de cáncer. El licopeno actuaría sobre las proteínas ligadas IGFBPs a este factor (Vrieling et al., 2007). En su trabajo, el citado autor administró durante ocho semanas 30 mg/día de licopeno procedente del tomate, observando cómo las concentraciones séricas de IGFBP-1 aumentaban en mujeres y como las de IGFBP-2 lo hacían tanto en varones como en mujeres, aunque concluyendo que dada la variabilidad interindividual de IGFBP-1 y IGFBP-2 es necesario profundizar más en estos estudios. De hecho, Voskuil no encontró este efecto del licopeno sobre IGFBP-1 y fueron dudosos los datos obtenidos sobre IGFBP-2 (Voskuil et al., 2008).

El papel del licopeno en la prevención del cáncer puede verse reforzado con la presencia de otras sustancias como los ácidos grasos omega-3. Así, se ha comprobado cómo bajas concentraciones de licopeno junto con ácido eicosapentaenoico (EPA) conllevan un menor riesgo de cáncer (Tang et al., 2008), especialmente de colon.

En cualquier caso, el punto de vista más generalizado es que el papel antiproliferativo del licopeno sobre las células tumorales y su efecto sobre la apoptosis es dosis – dependiente, y depende del tipo de células cancerígenas de que se trate (Salman et al., 2007). Esta vía de investigación sobre el efecto modulador de la expresión génica es reciente y ha despertado mucho interés tras el descubrimiento de cómo algunos fitoquímicos (genisteína y licopeno entre ellos) podrían mitigar procesos tumorales por esta vía (King-Batoon et al., 2008).

La conclusión más extendida entre los diferentes autores revisados es que el papel del licopeno en la prevención del cáncer debe ser objeto de revisiones y estudios más profundos tanto desde el punto de vista bioquímico como nutricional (Wane y Lengacher, 2006; Burgess et al., 2008).

1.4.2 Próstata. Este tipo de cáncer ocupa el tercer lugar entre todos por su incidencia entre los varones de todo el mundo, siendo el más diagnosticado en los hombres de mediana edad en los países desarrollados. Como se ha comentado más arriba, en efecto el teórico papel del licopeno sobre el cáncer de próstata está bien documentado (Salman et al., 2007; Everson y McQueen, 2004; Jian et al., 2005; Fraser et al., 2005; Guns y Cowell, 2005; Ansari y Ansari, 2005; Lindshield et al., 2007; Gunasekera et al., 2007) aunque ignoramos la dosis más adecuada y algunos autores temen que este efecto pueda ser baja y ligado a dosis muy elevadas de esta sustancia (Etminan et al., 2004). En cualquier caso, se dispone de estudios prospectivos y retrospectivos que indican claramente esta relación inversa entre la ingestión de licopeno y el riesgo de cáncer de próstata (Van Bremen y Pajkovic, 2008) que Wertz ha hecho extensiva a la hiperplasia benigna de próstata por la acción local ejercida sobre los andrógenos (Wertz et al., 2004).

Asimismo, sabemos que el licopeno se acumula en esta glándula y, más concretamente, en los núcleos de las células epiteliales. Su efecto, además de por su capacidad antioxidante, parece deberse a otros mecanismos de quimioprevención como la inducción de la apoptosis y a una actividad antiproliferativa y antimetastásica (Van Bremen y Pajkovic, 2008) no bien conocidos.

A este respecto, es bien conocido el trabajo de Ansari quien administró 10 mg diarios de licopeno a veinte pacientes afectados de cáncer de próstata metastásico hormonodependiente (HRPC) durante tres meses. En este caso, el licopeno parece que fue efectivo y seguro, no solamente disminuyendo las tasas del antígeno prostático específico (PSA), sino también mejorando la escala usada por los especialistas para valorar la progresión de la enfermedad (ECOG), el dolor óseo y los síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) (Ansari y Gupta, 2004), proponiendo incluso los autores su utilización antes que otros medicamentos sin duda más tóxicos. Asimismo, el simple consumo durante tres semanas de pasta aliñada con salsa de tomate previamente a una prostatectomía programada, parece producir un incremento del licopeno en sangre del cien por cien, constatando un menor daño en el ADN de los leucocitos y de los tejidos prostáticos, junto con una clara disminución del PSA explicado por el aumento de la apoptosis (Stacewicz-Sapuntzakis y Bowen, 2005; Ellinger et al., 2006).

Esta relación inversa entre la ingestión de licopeno y la cantidad de antígeno PSA se refiere en otros estudios que, adicionalmente, proponen un papel preventivo del carotenoide (ingiriendo por ejemplo 4 mg dos veces al día durante un año) frente al desarrollo neoplásico (Mohanty et al., 2005; Limpens et al., 2006). En el estudio de Schwarz, se encuentra un efecto beneficioso tras la ingestión por parte de pacientes aquejados de hiperplasia benigna de próstata (BPH), durante seis meses, de 15 mg diarios, encontrando que los síntomas mejoraban en ese grupo. Esta mejoría movía al autor a afirmar que el licopeno limitaría eficazmente la progresión de BPH (Schwarz et al., 2008). Liu también detalló cómo el licopeno puede reducir la producción de IGF-1 en esta patología (Liu et al., 2008).

Como es habitual, algunos autores señalan el papel sinérgico que otros fitoquímicos pueden tener junto con el licopeno en esta patología. Así, Jian indica el efecto reforzado del licopeno cuando se ingiere en un contexto dietético rico en té y otros vegetales y frutas, encontrando el autor aquí una explicación a la escasa frecuencia de este tipo de cáncer entre los varones chinos (Jian et al., 2007). También Vaishampayan lo relaciona con la soja, encontrando que su administración (15 mg de licopeno solo o junto con 40 mg de isoflavona de soja) es eficaz frente a cánceres hormonodependientes o no (Vaishampayan et al., 2007) aunque sin hallar un efecto aditivo entre ambas sustancias.

Sin embargo, hay que citar el estudio prospectivo de Kirsh realizado entre 1.338 casos de cáncer de próstata y donde se concluye que no hay evidencia de ninguna protección tras la ingestión de cantidades elevadas de tomate o de licopeno (Kirsh et al., 2006). Tampoco Jatoi obtuvo resultados positivos tras la administración de 30 mg de licopeno diariamente en pacientes aquejados de cánceres prostáticos no dependientes de andrógenos (Jatoi et al., 2007) ni Schwenke con 15 mg diarios durante seis meses, al menos en lo que respecta a pacientes en fases avanzadas de la enfermedad (Schwenke et al., 2009). En el trabajo de Bunker, la dosis recibida fue de 30 mg diarios durante cuatro meses y refiere en este caso una variación inespecífica del PSA simplemente transitoria y sin más relevancia (Bunker et al., 2007). Ellinger considera que la ingestión aislada de licopeno no protege frente al desarrollo de este tipo de cáncer. Pese a ello, no descarta que el tomate y sus derivados puedan formar parte de una posible terapia (Ellinger et al., 2009) tras ulteriores estudios.

1.4.3 Páncreas. El licopeno, ingerido sobre todo a través de los tomates, se ha relacionado con una importante reducción (del 31%) de los casos de cáncer de páncreas. Probablemente, dietas ricas en licopeno podrían disminuir este riesgo (Nkondjock et al., 2005).

1.4.4 Patología cardiovascular. Aún persisten dudas sobre el papel global de los carotenos en la prevención - riesgo cardiovascular. De este modo, se ha referido como algunos carotenos (luteína, zeaxantina, retinol), en cantidades elevadas en plasma, se relacionan con un mayor riesgo cardiovascular. Por el contrario, este vínculo no existe en lo que respecta a betacriptoxantina, alfacaroteno y betacaroteno y tampoco las elevadas concentraciones en plasma de licopeno están asociadas con un elevado riesgo cardiovascular, ni siquiera en ancianos (Sesso et al. b), 2005). En cualquier caso, los resultados de otras investigaciones ya mostraron hace tiempo cómo se podía esperar un efecto beneficioso sobre la salud cardíaca derivada del consumo de zumos de tomate (Das et al., 2005), bien es cierto que sin que estos estudios fueran concluyentes como señaló Riccioni en sus estudios con diferentes antioxidantes (Riccioni et al., 2008).

Dentro del complejo panorama de las patologías cardiovasculares, ciertamente el papel ejercido por las plaquetas se considera muy importante. En este sentido, el licopeno tiene un efecto antiplaquetario que probablemente implica a las siguientes vías: a) la inhibición de la actividad de la fosfolipasa C, efecto seguido de la inhibición del metabolismo del inositol fosfato así como de la formación del tromboxano B₂, b) la activación de la formación de GMP cíclico/nitrato en las plaquetas, con la consiguiente inhibición de su agregación. Esto significa que el tomate y otros alimentos hechos a base de tomate pueden ser especialmente beneficiosos en la prevención de la agregación plaquetaria en la trombosis (Hsiao et al., 2005).

Algunos autores han indicado el papel protector del licopeno al limitar el daño en el miocardio provocado tras una isquemia y reperfusión. Este papel puede conllevar, asimismo, una mejora sustancial en la recuperación funcional del corazón que, suponemos, se deriva de la disminución-supresión del estrés oxidativo y, por consiguiente, del daño acaecido en el miocardio (Bansal et al., 2006). Esto es lo que demostraron Bose y Agrawal tras suministrar durante 60 días un suplemento de tomate a un grupo con enfermedad coronaria y observar la consiguiente mejora en los niveles séricos de enzimas relacionadas con la actividad antioxidante, así como con una disminución de la peroxidación lipídica, todo ello sin que se detectara finalmente un cambio significativo en la composición lipídica (Bose y Agrawal, 2007), lo que lleva a los autores, en este caso, a afirmar que el licopeno puede tener un potencial efecto como antioxidante pero no, desde luego, como agente hipolipemiente.

El licopeno puede reducir la formación de células espumosas, vinculadas a las LDL, disminuyendo la síntesis de lípidos (Napolitano et al., 2007; Neyestani et al., 2007). Para Hung, el licopeno puede ser capaz de inhibir la activación del NF-kappaB inducida por el TNF-alfa así como la interacción monocito-endotelio, lo cual sugeriría un papel antiinflamatorio que, al menos en parte, explicaría el papel del licopeno en la prevención de las patologías cardiovasculares (Hung et al., 2008).

Este efecto del licopeno se ha comparado en algún estudio con el ejercido por ciertos medicamentos como la fluvastatina. En efecto, a dosis elevadas en animales de experimentación resulta más eficaz que el propio medicamento, reduciendo ambas sustancias las placas ateromatosas de la aorta incluso tras recibirse dietas ricas en grasa (Hu et al., 2008).

Hay que señalar la posible interacción del licopeno con el aceite de oliva, la cual parece ser especialmente beneficiosa disminuyendo, en conjunto, el riesgo cardiovascular al mejorar el perfil lipídico sérico (Ahuja et al., 2006).

1.4.5 Inmunidad. En definitiva, parece claro que la ingestión habitual de tomate, y de sus productos derivados, se asocia con unos favorables efectos inmunomoduladores (Bessler et al., 2008). Así, el licopeno induce una variación dosis - dependiente de diferentes interleukinas (IL): incremento de la IL-1beta y una disminución de las IL-2 e IL-10, mientras que IL-1ra e IL-6 no se ven modificadas tras la ingestión de licopeno en otros trabajos (Bessler et al., 2008; Napolitano et al., 2007). También el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) ve inhibida su producción, lo que refuerza la idea de que el licopeno ejerce un papel antiinflamatorio (Hung et al., 2008). Un papel que podría conllevar la atenuación de la respuesta inmune dependiente de las células T (Neyestani et al., 2007).

1.4.6 Diabetes. Se ha sugerido que el licopeno puede actuar como protección frente a la diabetes tipo II debido precisamente a su poder antioxidante. Sin embargo, no existe un acuerdo entre los diferentes autores al respecto, ya que se ha visto como esta evidencia es demasiado débil en estudios como los de Wang, donde se revisó este supuesto papel preventivo en 35.783 mujeres sanas (Wang et al., 2006) con el resultado ya citado. Sí que este papel parece más fundado en lo que se refiere a la disminución de las complicaciones a largo plazo, especialmente las vasculares, propias de la diabetes (Neyestani et al., 2007). En este sentido, se ha visto como el tratamiento crónico con licopeno (1-4 mg/kg) disminuye de forma dosis dependiente el déficit cognitivo, el estrés oxidativo y la inflamación aumentando al mismo tiempo la actividad acetil-colinesterásica en ratas diabéticas. Según los autores, el licopeno podría tener un papel terapéutico potencial en la merma intelectual y de la memoria ligada a la progresión de la diabetes (Kuhad et al., 2008).

Actualmente, estudios recientes insisten en el papel beneficioso del licopeno frente a la hiperglicemia produciendo disminuciones de la misma también de forma dosis - dependiente así como un incremento de la liberación de insulina y una disminución en sustancias como los TBARs con el consiguiente incremento de CAT, SOD y GPx con mejora en el perfil lipídico sanguíneo. Este efecto se ha observado más eficaz, en animales de experimentación, a dosis elevadas de alrededor de 90 mg/kg de peso corporal (Ali y Agha, 2009).

1.4.7 Asma. Se ha dicho que niveles bajos de licopeno en plasma se relacionan con la presencia de asma en ciertos pacientes (Riccioni et al., 2006; Riccioni et al., 2007), sugiriéndose que la suplementación con licopeno y con alimentos ricos en vitamina A aliviarían esta patología. Esta afirmación se ve complementada con datos recientes que revalorizan el papel de una dieta rica en sustancias antioxidantes (Wood et al., 2008) en general, y en licopeno en particular, para la mejora de los síntomas asmáticos.

1.4.8 Osteoporosis. Se ha determinado que grupos de población con ingestas elevadas de licopeno mantienen tasas superiores de licopeno en plasma y, consecuentemente, cifras inferiores de cross-linked N-telopéptidos del colágeno tipo I (NTx). De este modo, el licopeno reduce los niveles de los marcadores de renovación ósea en mujeres postmenopáusicas que podrían reducir el riesgo de osteoporosis (Rao et al., 2007).

Esta inhibición de la resorción ósea se ha comprobado por otros autores tanto in vivo como in vitro, relacionándose a las mujeres con mayores ingestiones de licopeno con un menor riesgo de fractura de cadera así como de fracturas no vertebrales en general (Sahni et al., 2009).

1.4.9 Dermatología. Se ha relacionado el consumo elevado de antioxidantes en la dieta con un menor fotoenvejecimiento (Darvin et al., 2008; Stahl et al., 2006). Asimismo, otros autores han pensado en el posible papel de estas sustancias para disminuir el enrojecimiento de la piel (Darvin et al., 2008). El licopeno y los carotenos podrían pues contribuir a una protección duradera frente a la radiación ultravioleta.

1.4.10 Estomatología. Se ha sugerido en los últimos años que el licopeno podría tener interés en el tratamiento de la leucoplaquia (Singh et al., 2004) así como en el de la fibrosis oral submucosa (Kerr, 2007) y en diferentes formas de gingivitis (Chandra et al., 2007).

1.4.11 Oftalmología. Es bien conocido como tasas bajas de carotenoides en suero se relacionan con mayor riesgo de degeneración macular ligada a la edad (ARMD). El licopeno, a la luz de los conocimientos actuales, es el único carotenoide que se ve alterado en pacientes que presentan esta patología, con lo que su uso preventivo podría ser de gran interés (Cardinault et al., 2005).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Aunque el efecto del licopeno es conocido en la regulación de los niveles de colesterol y en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, es sabido que su ingestión diaria es baja. Por otro lado, son bien conocidos los efectos del aceite virgen de oliva así como que el licopeno aumenta su biodisponibilidad cuando se ingiere en un medio lipídico.

Basándonos en ello, surgió el planteamiento que define el eje principal de esta investigación.

1. Objetivo general

1.1 Estudiar el posible efecto del aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno sobre el perfil lipídico sanguíneo así como su efecto protector sobre diferentes biomarcadores del daño oxidativo en personas con hipercolesterolemia moderada no familiar y sin tratamiento farmacológico.

2. Objetivos específicos

2.1 Evaluar el efecto del licopeno sobre el perfil lipídico, valorándolo antes y después de la ingestión de aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno.

2.2 Evaluar el efecto del licopeno sobre biomarcadores de oxidación e inflamación determinando la capacidad antioxidante total plasmática así como los biomarcadores de estrés oxidativo en plasma y linfocitos.

2.3 Conocer los posibles beneficios derivados de la ingestión de licopeno frente a otra sustancia también conocida por su papel en el metabolismo oxidativo como es el aceite de oliva virgen.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental.

Se ha procedido a seleccionar la muestra de pacientes, según se describe a continuación, con unas características concretas de inclusión. El ensayo se ha dividido en dos Fases (Fase I y Fase II).

1.1 Selección de la muestra

Se trata de un Estudio **abierto aleatorizado** para evaluar el efecto de la administración de licopeno sobre los niveles de colesterol plasmático. En España, los niveles de colesterolemia se cifran, según estudios recientes (Sánchez-Chaparro et al., 2006), en 198 ± 40 mg/dL. Dicho estudio se ha realizado en un total de 216.914 individuos de toda España con edades comprendidas entre los 16 y 74 años.

Por otra parte, un metaanálisis de ensayos aleatorizados ha puesto de manifiesto que por cada 10% de descenso de la colesterolemia se produce una reducción de un 15% de la mortalidad por cardiopatía isquémica y de un 11% de la mortalidad total (Plaza-Pérez et al., 2000; Gould et al., 1998).

En consecuencia, para detectar una reducción de la colesterolemia del 10%, con una probabilidad de cometer un error Tipo I de un 5% ($\alpha = 0,05$), una potencia del 80% ($\beta = 0,15$) y en contraste unilateral, sería necesario estudiar 45 individuos por grupo.

1.1.1 Características de inclusión:

- Pacientes con hipercolesterolemia no familiar, sin tratamiento farmacológico ni patología asociada.
- Edad superior a 18 años
- Los pacientes son elegidos aleatoriamente en el municipio de Morzarzal, Madrid.
- Todos los participantes en el estudio son convenientemente informados de sus características y firman un consentimiento informado.
- Se seleccionaron dos grupos de 45 personas cada uno con niveles de colesterol superiores a 220 mg/dL que voluntariamente deciden colaborar en el estudio.
- Se establecen cuestionarios y encuestas alimentarias donde quede reflejado el estilo de vida, los ritmos vitales y la dieta habitual que suelen seguir. No se interfirió en sus prácticas alimentarias habituales salvo en la sustitución de 40 mL de su grasa diaria habitual por idéntica cantidad de aceite de oliva virgen con o sin licopeno.

1.2 Desarrollo y fases del Estudio.

Constó de las siguientes Fases:

Fase I se procedió al estudio preliminar de su dieta habitual mediante un registro dietético autoadministrado de una semana de duración. Asimismo, se realizó una extracción de sangre para realizar las pruebas de control iniciales. Se hizo entrega de la cantidad de aceite (con y sin licopeno) necesaria para realizar el estudio con las instrucciones de utilización correspondientes.

Fase II del estudio. Se establecieron dos grupos:

Grupo A: La dieta normal del grupo se suplementó con una cantidad diaria prefijada de 40 mL de aceite de oliva virgen durante un mes sustituyendo cantidades iguales del aceite que utilizaba el sujeto en su alimentación cotidiana. Se entregaron por escrito unas instrucciones de ingestión para evitar un uso inadecuado. Posteriormente se realizó otra extracción de sangre (20 mL) para poder contrastar los resultados.

Grupo B: Como en el Grupo anterior, la dieta se suplementó con una cantidad diaria de 40 mL aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno durante un mes. Posteriormente se realizó la extracción de sangre (20mL) para poder contrastar los resultados con el grupo A.

1.3. Procesado de las muestras de sangre:

Las extracciones sanguíneas se realizaron aprovechando las revisiones analíticas habituales de los pacientes en su Centro de salud.

2. Materiales.

2.1 Reactivos.

Los reactivos para las soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas, son proporcionados por Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA), disolventes y otros reactivos de Scharlau (Barcelona, España) y Merck (Darmstadt, Germany). Los tests enzimáticos de triglicéridos GPO-PAP y el de colesterol CHOD-PAP están comercializados por Roche Diagnostics GMBH, D-68298 Mannheim (Alemania). Las enzimas modificadas por PEG (polietilenglicol) y sulfato de alfa-ciclodextrina y dextrano que se utilizan para la determinación directa de HDL-colesterol están comercializados por Roche Diagnostics GMBH, D-68298 Mannheim (Alemania). Los kits de la LDL oxidada son de Biomédica Medizinprodukte (GMBH and Co KGA-1210, Wien). El agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore).

2.2 Suplementos.

Se dispuso de dos variedades del mismo aceite de oliva virgen extra procedente de un único productor y del mismo lote de producción:

A) Aceite de oliva virgen

B) Aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno (7 mg cada 20 mL) Aceiterol[®].

El aceite, de ambas clases, se entregó en envases monodosis de 20 mL cada uno. El paciente y el sanitario podían identificar cada diferente tipo de aceite en todo momento dado el característico color anaranjado-rojizo que posee el licopeno y, por lo tanto, el aceite enriquecido con esta sustancia. Por ese motivo, no es factible realizar este estudio como si fuese uno de tipo "doble ciego".

Tabla 1. Resumen de determinaciones y ensayos realizados.

I. Ensayos químicos

1. Determinación de la capacidad antioxidante total en aceite y en plasma

- a. Método del ABTS
- b. Método del DPPH
- c. Método del FRAP
- d. Determinación de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo
- e. Estudio de la capacidad estabilizadora del radical superóxido

II. Ensayos biológicos

1. Determinaciones del perfil lipídico:

- a. Determinación de triglicéridos.
- b. Determinación de colesterol total.
- c. Determinación de HDL colesterol.
- d. Determinación de LDL colesterol.
- e. Determinación de LDL oxidada.

2. Determinaciones de marcadores del estrés oxidativo:

- a. Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas.
- b. Determinación de TBARS en plasma.
- c. Determinación de carotenoides en plasma.

3. Determinaciones relativas a parámetros de inflamación:

- a. Determinación de proteína C reactiva.
- b. Determinación de la interleukina 6.
- c. Determinación del CD 40 ligando soluble (sCD40L) en suero.
- d. Determinación del antígeno prostático específico total y libre

3. Métodos.

Se describen a continuación todos los métodos utilizados que, adicionalmente, aparecen resumidos en la Tabla 1.

3.1 Análisis del consumo alimentario

Se ha procedido al estudio de la dieta habitual de los pacientes seleccionados e incorporados a la muestra mediante un registro dietético autoadministrado de una semana de duración. Posteriormente, los datos obtenidos han sido valorados nutricionalmente mediante un programa informático adecuado (Alimentador 2000, Sociedad española de dietética) tras su conversión de datos de tipo cualitativo a cuantitativos utilizando raciones estándar de alimentos (Gómez-Candela et al., 2007).

3.2 Ensayos químicos

Se ha procedido a determinar la actividad antioxidante total y antirradical del aceite de oliva virgen y del aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno. Para ello, determinamos la capacidad del aceite para secuestrar radicales estables y para inhibir los radicales superóxido e hidroxilo, el radical peroxilo así como su poder reductor ($F^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) entre otras determinaciones.

3.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante total en aceite y en plasma

Se realizaron las siguientes determinaciones tanto en el aceite como en el plasma: método del ABTS, método del DPPH, método del FRAP así como el estudio de la capacidad estabilizadora del radical superóxido.

a. Método del ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método ABTS^{•+} de Miller y Rice Evans (1.997) modificado por Pellegrini y cols. (1999), basado en la oxidación del ABTS (2,2´azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sulphonic acid) diamonium salt) por el persulfato potásico para formar el radical ABTS^{•+}, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. La generación del reactivo ABTS^{•+}, se realizó mezclando ABTS 7mM con la solución de persulfato potásico 2.45mM en una proporción 1:1. La determinación de la actividad antioxidante total se realizó espectrofotométricamente a 734 nm añadiendo alícuotas de las muestras (5µl de plasma y 40µl de aceite diluido 1/5 en metanol) al reactivo de ABTS^{•+} (960µl). Los resultados se expresan como TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). La recta de calibrado con trolox se realizó a partir de una solución estándar de trolox.

b. Método del DPPH

Se siguió el método de Brand-Williams de 1995, usando el radical estable 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl que tiene su máximo de absorción a 517 nm. A 980 µl de DPPH 60 µM se le añadieron 20 µl de aceite. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, tiempo necesario para la estabilidad de la muestra y se evaluó espectrofotométricamente a 517 nm. Los resultados son expresados en milimoles de Trolox utilizando una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox.

c. Método del FRAP

Este método se basa en el estudio del poder reductor de la muestra de aceite, basado en el método de Benzie y Strain (1996). La mezcla de la reacción se prepara mezclando 25 mL de 0.3M de acetato sódico pH:3,6, 2,5 mL de 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-S-triazine), 2,5 mL de 20 mM FeCl₃, y 3 mL de agua. 20 µl del extracto de polifenoles de la muestra de aceite fue mezclado con 970 µl de la mezcla reactiva e incubado a 37°C durante 30 minutos. Los resultados son

expresados como milimoles de Fe(II) usando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de FeSO_4 .

d. Determinación de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo

Se utilizó el método de la desoxirribosa, expuesta a la degradación oxidativa por el radical hidroxilo generado a través de la reacción de Fenton, siguiendo el método de Halliwell y Gutteridge (1.981). Para un volumen de 1mL se utilizó la siguiente mezcla reactiva: 10 μl de desoxirribosa 100mM, 10 μl ácido ascórbico 60mM, 10 μl H_2O_2 1mM, 50 μl de plasma o del extracto de aceite, 10 μl de FeCl_3 10mM, 10 μl de EDTA 10 mM y tampón fosfato de sodio 24mM en 15mM de NaCl pH 7,4. Se incuban todos los tubos a 37°C durante 1 hora, transcurrido este tiempo se añadía 1,5 mL de TCA al 2.8%, 1mL de TBA al 1% y se incubaba a 100°C durante 15 minutos. Se deja enfriar y se lee la absorbancia a 532nm.

e. Estudio de la capacidad estabilizadora del radical superóxido

La actividad barredora o "scavenger" frente al radical superóxido se ensayó mediante un método espectrofotométrico basado en el método del NBT que genera un compuesto coloreado que absorbe a 560 nm (Liu 1997). Se prepara la mezcla de 50 μl de NADH 77 μM , 50 μl de NBT (50 μM) y 5 μl de PMS (3,3 μM) en 16 mM tris-ClH pH: 8,0 y 200 μl de muestra. Los resultados se expresan como % de inhibición.

3.3 Ensayos en muestras biológicas

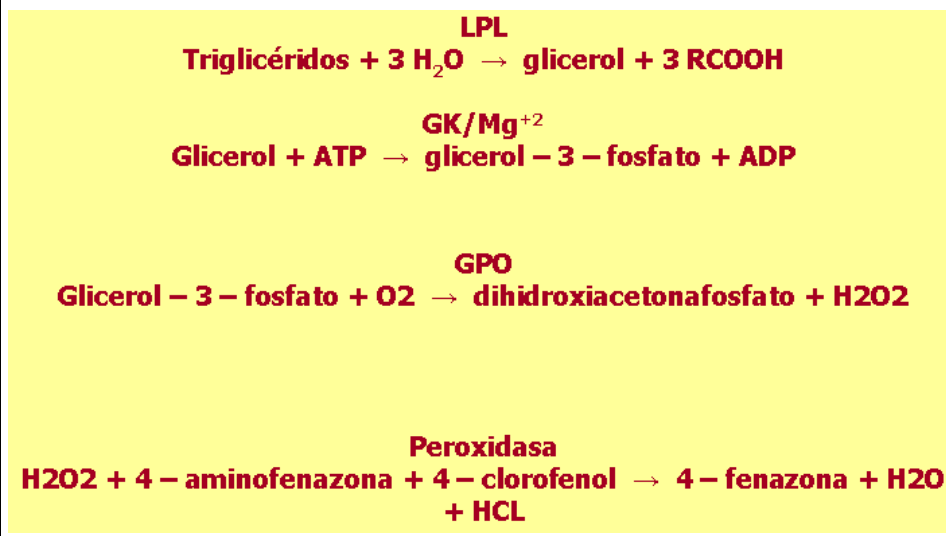
Los sujetos del estudio han ingerido durante su desarrollo dos envases de 20 mL conteniendo bien aceite de oliva virgen, bien aceite de oliva virgen enriquecido con 7 mg de licopeno por unidad, analizándose posteriormente su efecto sobre los parámetros descritos a continuación.

3.3.1 Determinaciones del perfil lipídico:

El perfil lipídico solicitado incluyó los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y LDL oxidada.

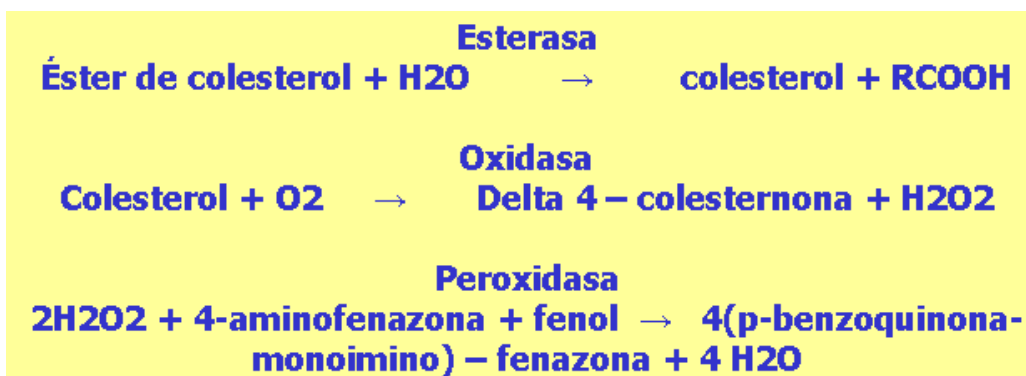
a. Determinación de triglicéridos. Para la determinación de los triglicéridos se utilizó el autoanalizador MODULAR EDDPP-ROCHE y el test enzimático triglicéridos GPO-PAP, comercializado por Roche Diagnostics GMBH, D-68298 Mannheim (Alemania). Siendo el rango de normalidad para dicho test de 50-170 mg/dL. Principio del test: El método se basa en las siguientes reacciones acopladas: Los triglicéridos se someten a la acción de la lipoprotein lipasa que produce una hidrólisis rápida y completa a glicerol. Posteriormente, y tras fosfatación, se produce dihidroxiacetonafofosato y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de un cromógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol formará un compuesto coloreado (4-fenazona) que es directamente proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en la muestra (Figura 2).

Figura 2. Determinación de triglicéridos.



b. Determinación de colesterol total. Para la determinación del colesterol total se utilizó el autoanalizador MODULAR EDDPP. ROCHE y el test enzimático colesterol CHOD-PAP, comercializado por Roche Diagnostics GMBH, D-68298 Mannheim (Alemania). Siendo el rango de normalidad para dicho test de 70-220 mg/dL. Principio del test: El método está basado en la hidrólisis de los ésteres de colesterol presentes en la muestra por la colesterol esterasa dando lugar a colesterol libre y ácidos grasos. Posteriormente, y tras oxidación enzimática con la colesterol oxidasa, se formará peróxido de hidrógeno y colesterina. Finalmente, este peróxido de hidrógeno se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4- aminofenazona, en presencia de peroxidasa, formando una benzoquinona, cuya coloración es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra (Figura 3).

Figura 3. Determinación de colesterol total.



c. Determinación de HDL colesterol. La determinación directa de colesterol HDL mediante el empleo de enzimas modificadas por PEG (polietilenglicol) y sulfato de alfa-ciclodextrina y dextrano, comercializado por Roche Diagnostics GMBH, D-68298 Mannheim (Alemania). Se utilizó el autoanalizador MODULAR EDDPP. ROCHE, siendo el rango 35 – 60 mg / dL. Principio del test: La PEG-colesterol esterasa rompe los ésteres de colesterol-HDL en colesterol libre y ácidos grasos que tras oxidación, formará peróxido de hidrógeno, el cual por acción del

carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según procedimiento desarrollado por Levine et al. (1980) con algunas modificaciones de Tian et al. (1998). La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente ($\epsilon_{373}=21.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina. La cantidad de proteína utilizada oscila entre 0,5 – 1 mg/mL añadiendo tampón de conservación de mitocondrias hasta 1 mL de volumen final. Centrifugamos a 13600 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante añadimos estreptomycin sulfato 10 % con tampón Hepes 50 mM pH:7,2, en una proporción de 1/9 v/v. (Ahn et al., 1987). Centrifugamos y cogemos 200 μL del sobrenadante y añadimos 400 mL de 2,4 dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mM /CIH 2,5 M a las muestras y 400 mL de CIH 2,5 M a los controles. Incubamos 1 hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos y añadimos 1 mL de TCA al 20 %. Centrifugamos de nuevo a 12600 rpm durante 3 minutos. Recogemos el pellet y lo lavamos 3 veces con 1 mL de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v). Centrifugamos otra vez a 12600 rpm durante 3 minutos y recogemos el pellet. Finalmente añadimos 1 mL de Guanidina 6 N a pH: 2,3, centrifugamos a 12600 rpm y medimos el sobrenadante a una $\lambda=366 \text{ nm}$ frente a una solución de guanidina.

b. Determinación de TBARS en plasma. La determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico se realizó mediante la técnica de Santos et al. (1980). Pipeteamos en cada tubo 0.1 mL de plasma, y al blanco 0.1 mL de agua miliQ. Añadimos 0.4 mL de suero salino al 0.9% a cada tubo seguido de 1 mL de TCA 100 % en HCl 0,6 N y 0,2 mL de TBA 0,12 M en TRIS 0,26 M. Agitamos los tubos en el vórtex, se tapan y se ponen a hervir en un vaso de precipitados durante 30-45 minutos. Transcurrido el tiempo, se dejan enfriar durante 15-20 minutos. Añadimos 2 mL de agua miliQ. Agitamos en vórtex y se centrifugan a 3000 rpm 10'. Se mide la absorbancia a una $\lambda=532 \text{ nm}$.

c. Determinación de carotenoides en plasma. Se utilizo la técnica de Talwar et al. (1998). A 200 μl de plasma se añade agua destilada hasta un volumen de 1,1 mL Se añaden 70 μl de etanol al 0.01% de ácido ascórbico. Posteriormente, se añaden 2 mL de hexano, se voltea y centrifuga a 2.500 rpm durante 20 minutos.

La parte del hexano, aproximadamente 1,2 mL, se evapora con nitrógeno. A continuación el residuo se resuspende con 50 μl de tetrahidrofurano. Se voltea durante 1 minuto y se le añaden 100 μl de fase móvil. Se inyectan 50 μl . al HPLC. Condiciones cromatográficas: se utiliza una bomba Gilson de gradiente, con una columna YMCTM Carotenoid 5 μm (4.6x250 mm) de fase estacionaria C₃₀ de Waters. La fase móvil es metanol/ metil tert-butil éter de 80/20 a 10/90, en gradiente. La velocidad de flujo: 0.8 ml/minuto y la absorbancia se mide con un detector UV-V de Kontron Instruments a 450 nm.

3.3.4 Determinaciones relativas a parámetros de inflamación:

Se identificaron parámetros relativos a sustancias como la proteína C reactiva (PCR), la interleukina 6, la presencia de CD ligando soluble en suero así como el antígeno prostático específico.

a. Determinación de proteína C reactiva. Se utilizó la técnica de inmunoanálisis turbidimétrico de aglutinación. La muestra se coloca en una solución tampón y se mezcla con una suspensión de anticuerpo monoclonal de CRP antihumano de ratón. La CRP se fija al anticuerpo unido al látex y se

aglutina. La cantidad de la difusión de luz es proporcional a la concentración de CRP presente en las muestras. Las medidas se realizaron con el autoanalizador: COBAS INTEGRA 800 de ROCHE. Rango de normalidad: 0-5 mg/L.

b. Determinación de la interleukina 6. Kit ELISA, de Diaclone Research, para Interleukina-6 humana. Dicho kit permite identificar IL-6 en suero, plasma, soluciones tamponadas y cultivos celulares. El sistema reconoce IL-6 natural y recombinante. Principios del método. El kit está basado en un método ELISA en sándwich en fase sólida con un anticuerpo monoclonal específico para la interleukina 6. El proceso incluye una incubación de la muestra a la que se añade, tras lavado, la enzima streptavidin-peroxidasa, volviéndose a incubar y lavar. La intensidad de la reacción coloreada que se produce finalmente, tras la correspondiente adición del sustrato que actúa sobre la enzima ligada, es directamente proporcional a la concentración de IL-6 presente en las muestras analizadas.

c. Determinación del CD 40 ligando soluble (sCD40L) en suero. Para la determinación del sCD40L en plasma se utilizó el kit de Elisa de Diaclone (Francia). Principios del método. El kit está basado en un método ELISA en sándwich en fase sólida con un anticuerpo monoclonal específico para el sCD40L. Se añaden 20 µL de suero y el diluyente de muestra, posteriormente se añaden HRP- conjugado, se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación se lava tres veces con tampón de lavado y se añaden 100 µL solución TMB sustrato, se incuba durante 15 minutos a Tª ambiente y se añaden 100 µL de solución stop. Finalmente se lee en un lector de placas a 450 nm.

d. Determinación del antígeno prostático específico total y libre

d.1 determinación del antígeno prostático específico total en suero. Para dicha determinación se utilizó el kit PSA equimolar ELISA de DRG Instruments, Alemania. Principios del método. Se pipetea 25 µL de PSA de los estándares, de muestra y de controles. Se añaden 100 µL de solución de anticuerpo y se incuba durante una hora con agitación y a Tª ambiente, se lava y se añaden 100 µL de TMB HRP-sustrato. Se incuba en oscuridad a Tª ambiente durante 30 minutos y finalmente se lee en un lector de placas a 620 nm.

d.2 determinación del antígeno prostático específico libre en suero. Para dicha determinación se utilizó el kit PSA libre equimolar ELISA de DRG Instruments, Alemania. Principios del método. Se pipetea 50 µL de PSA de los estándares, de muestra y de controles. Se añaden 100 µL de solución de anticuerpo y se incuba durante una hora con agitación y a Tª ambiente, se lava y se añaden 100 µL de TMB HRP-sustrato. Se incuba en oscuridad a Tª ambiente durante 30 minutos. Se añaden 100 µL de solución stop, se incuba durante 15 minutos y finalmente se lee en un lector de placas a 450 nm.

3.4 Estudio estadístico y análisis de los Datos

Las distintas repeticiones enunciadas en los respectivos apartados ponen de manifiesto que se obtuvieron datos suficientes como para poder aplicar distintos tratamientos estadísticos, los cuales se llevaron a cabo con el programa Statgraphics Plus para Windows (Manugistics Inc, 1997).

IV. RESULTADOS.

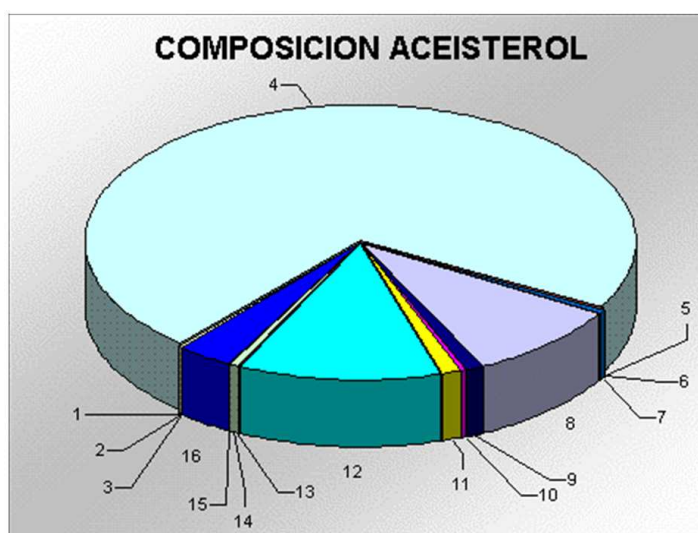
1. Ensayos químicos.

Aceiterol® es un alimento producido a partir de aceite de oliva virgen extra ecológico, obtenido de la variedad morisca, enriquecido con un extracto de tomate (su oleorresina de extracto natural sin aditivos) de elevado contenido en licopeno. En el producto terminado y listo para su consumo, la cantidad de licopeno es de 11,10 mg (según datos del fabricante) por envase de 20 mL, siendo la concentración de polifenoles totales de 2,21 mg por cada envase de esta cantidad.

Siendo el elemento básico del producto el aceite de oliva, encontramos (Tabla 2) que porcentualmente el ácido oleico representa en volumen el 71,62%, el ácido palmítico el 11,96%, el ácido linoleico el 9,29%, el ácido esteárico el 3,24% y el ácido linolénico el 1,07%. El licopeno se halla en el producto en concentraciones del 0,05%.

Tabla 2. Composición porcentual (%) de Aceiterol por envase (20 mL)

nº	elemento	%
1	licopeno	0,05
2	betacaroteno	0,005
3	fitoesteroles	0,16
4	oleico	71,62
5	tocoferoles	0,04
6	Fitoeno/fitoflueno	0,01
7	Aceite de tomate	0,58
8	linoleico	9,29
9	linolénico	1,07
10	gadoleico	0,26
11	palmitoleico	1,03
12	palmítico	11,96
13	margaroleico	0,14
14	araquídico	0,47
15	fosfolípidos	0,07
16	esteárico	3,24



1.1 Capacidad antioxidante y antirradicalaria del aceite de oliva virgen extra con y sin licopeno.

1.1.1 De los aceites:

La capacidad antioxidante total de los aceites fue evaluada utilizando tres métodos distintos. Ello es consecuencia de las diferencias y limitaciones que presentan las diferentes metodologías analíticas con las consiguientes variaciones en sus resultados. Así, los métodos utilizados fueron el método del ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico) sal de diamonio, el método del DPPH (2,2-difenil-1-pirilhidracil radical libre), ambos resultados están expresados en TEAC (actividad antioxidante equivalente al trolox) y el método FRAP (ferric reducing antioxidant power) como indicador del estado reductor y donde el resultado es expresado como $\mu\text{mol/mL}$ de FeSO_4 .

Los resultados se muestran en la Figura 6, donde se puede observar la capacidad oxidante dependiendo del método empleado. La contribución a la capacidad antioxidante de los componentes de naturaleza lipofílica queda reflejado en los valores de capacidad antioxidante más altos obtenidos en la muestra de aceite con licopeno por el método del DPPH frente al ABTS donde apenas hay diferencia. Sin embargo, en relación con la

capacidad reductora medida por el método FRAP, los resultados muestran que la actividad es significativamente menor en el aceite con licopeno.

1.1.2 Del plasma:

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los aceites para estabilizar especies oxigénicas reactivas muy frecuentes producidas "in vivo". Estas diferentes especies se forman como resultado del propio metabolismo oxigénico del organismo.

Para realizar esta valoración, se determinaron: a) la actividad estabilizadora del radical superóxido (SRSA) así como b) la actividad estabilizadora del radical hidroxilo (HRSA) tras la ingestión de los diferentes tipos de aceite (con y sin licopeno). Los resultados (Figura 7) muestran que todos los tipos de aceites tienen mayor capacidad inhibidora frente al radical superóxido que frente al radical hidroxilo. Adicionalmente, encontramos que esta capacidad estabilizadora es significativamente mayor cuando se trata de aceite enriquecido con licopeno.

En resumen, se puede decir que el enriquecimiento del aceite con licopeno mejora su capacidad antioxidante en medios lipofílicos así como la capacidad estabilizadora de los radicales hidroxilo, no afectando sin embargo este enriquecimiento a la capacidad antioxidante en los medios hidrofílicos ni tampoco a la actividad estabilizadora del radical superóxido.

2 . Ensayos en muestras biológicas.

2.1 Biodisponibilidad del licopeno y de otros carotenoides en sangre

Se ha procedido a determinar la presencia y concentración de licopeno en el plasma de aquellos individuos que ingirieron aceite de oliva virgen y aceite suplementado con licopeno. Los resultados señalan que el licopeno contenido en Aceiterol es absorbido por los participantes en el estudio al detectarse concentraciones de hasta un 33% superiores que en los pacientes que únicamente recibieron aceite de oliva y de un 34% frente al grupo de control (Figura 8).

Asimismo, tras ingerir Aceiterol se encuentran valores de α -caroteno superiores en un 14% al grupo de control (valores no significativos dada su dispersión) y significativamente superiores en un 25% de β -caroteno. No se detectan variaciones de ningún tipo en el caso de la β -criptoxantina (Figura 9).

2.2 Metabolismo lipídico

Hemos determinado los niveles de triglicéridos (TG), colesterol, las fracciones de colesterol (HDL, LDL) así como los niveles de LDL oxidada. Los resultados obtenidos nos permiten observar (Figura 10) cómo se produce un aumento significativo (un 11%) en los niveles de TG en el grupo suplementado con el aceite de oliva enriquecido con licopeno con respecto a su control ($p < 0,005$). En cambio, no se produce ningún cambio significativo en los niveles de colesterol total y LDL-c (Figura 11 y 12).

Sin embargo, sí observamos un aumento significativo del 5% ($p < 0,005$) en los niveles de HDL colesterol (Figura 13) tras el periodo de suplementación en todos los casos, tanto con el aceite de oliva como con el aceite enriquecido con licopeno sin que se presenten diferencias entre ambos. Respecto a la LDL oxidada, observamos que el grupo sin licopeno no presenta diferencias significativas respecto a su control. En cambio, el grupo con licopeno presenta una disminución significativa del 14% ($p < 0,05$) respecto a su control (Figura 14). Dichos resultados señalan un posible papel protector del licopeno ante la patología cardiovascular.

2.3 Capacidad antioxidante

En los ensayos realizados (capacidad antioxidante total por el método ABTS y capacidad estabilizadora del radical hidroxilo), la capacidad antioxidante fue mayor (18% y 17%) en el grupo de personas que ingirieron aceite enriquecido con licopeno que en el grupo de control y que en el grupo que ingirió únicamente aceite de oliva. Sin embargo, las altas desviaciones obtenidas en los resultados debido a la variabilidad intragrupo, no permiten señalar estas diferencias como significativas (Figura 15, Figura 16).

2.4 Estrés oxidativo

Hemos procedido a cuantificar en esta valoración el daño inducido a distintas macromoléculas. En concreto a lípidos (Figura 17), mediante la determinación de los niveles de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), y a proteínas (Figura 18) determinando el contenido en grupos carbonilo (GC), antes y después de la suplementación.

Cuando expresamos los resultados en porcentajes (con muestras apareadas) podemos observar una disminución significativa ($p < 0,05$) en el grupo de individuos que ha suplementado su dieta con aceite de oliva enriquecido con licopeno, tanto en los niveles de TBARS (6%) como de grupos carbonilo (15%), respecto a su control.

Dichos resultados ponen de manifiesto el efecto que está ejerciendo, en el transcurso del ensayo, el aceite de oliva enriquecido con licopeno sobre el estrés oxidativo causado sobre los lípidos y las proteínas.

2.5 Parámetros de inflamación

Como marcadores de inflamación hemos determinado los niveles de diferentes sustancias presentes en plasma que se consideran buenos marcadores de estos procesos: la proteína C reactiva (PCR), CD 40 ligando soluble (sCD40L) e interleucina 6 (IL-6).

Respecto a la proteína C reactiva, observamos una disminución significativa del 15% ($P > 0,005$) en los individuos cuya dieta había sido suplementada con aceite de oliva virgen enriquecido con licopeno (Figura 19).

Respecto a los niveles de CD 40 ligando soluble (sCD40L) (Figura 20), observamos un aumento significativo ($p < 0,05$) del 34% en aquellos individuos que habían tomado aceite de oliva virgen extra sin licopeno. En los que habían recibido un suplemento con licopeno, no se encuentran diferencias significativas.

En los niveles de IL-6, observamos una disminución, que resulta ser significativa ($p < 0,05$), en el grupo que ha tomado aceite con licopeno del 11%. En el caso del aceite virgen sin licopeno, no se hallan resultados estadísticamente significativos (Figura 21). Este conjunto de resultados parecen indicar que el aceite de oliva enriquecido con licopeno está produciendo un efecto protector ante los procesos inflamatorios relacionados con la patología cardiovascular.

Resumen de datos obtenidos.

De los resultados obtenidos en el estudio podemos deducir que el aceite de oliva enriquecido con licopeno aumenta los niveles de triglicéridos, aunque disminuye los niveles de la LDL oxidada. Respecto a los parámetros marcadores de estrés oxidativo, observamos un aumento en la capacidad antioxidante y una disminución significativa en los TBARS y en el contenido en grupos carbonilo. Asimismo, cuando determinamos los parámetros de inflamación, observamos una disminución significativa en la PCR y en la IL-6. En conclusión, el aceite de oliva virgen enriquecido con extracto de tomate, mayoritariamente licopeno, disminuye los parámetros de estrés oxidativo, por tanto puede tener un papel protector frente a patologías mediadas por radicales libres, tales como los procesos cardiovasculares.

2.6 Licopeno y marcadores de cáncer de próstata

El antígeno prostático específico (PSA) es una proteína producida por la próstata y que participa en la disolución del coágulo seminal. Su producción depende de la presencia de andrógenos y del tamaño de la glándula prostática. Una pequeñísima parte de este PSA pasa a la circulación sanguínea y es precisamente el que se mide para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer de próstata. Otra prueba que se puede realizar es el llamado PSA libre: normalmente el PSA en sangre va unido a otras proteínas, quedando una pequeña fracción libre. Los pacientes con cáncer de próstata tienen menor porcentaje de PSA libre, mientras que los que sufren una hiperplasia benigna de próstata tienen una mayor proporción de PSA libre.

El riesgo de cáncer aumenta si la relación entre PSA libre y PSA total es menor al 25%. Mientras menor sea la proporción, mayor es la probabilidad de padecer un cáncer prostático. Si el resultado del PSA total, por ejemplo, está entre 4-10 ng/mL - un valor anormal, con un riesgo calculado del 25% de tener un cáncer de próstata - y al mismo tiempo cursa con un bajo porcentaje del PSA total siendo PSA libre (menor del 10%) significa que la probabilidad de tener un cáncer de próstata aumenta a un 50% y que por ello es necesario realizar una biopsia diagnóstica. Un reciente estudio encontró que si los hombres con resultados de PSA en el límite superior (4 -10 ng/mL) se realizaran una biopsia de próstata, ésta se justificaba sólo cuando el porcentaje de PSA libre era menor del 25 %. Los valores de la PSA están en función de la edad (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles considerados normales de PSA según la edad.

EDAD	NIVELES
De 40-49 años	0.0-2.5 ng/ml
De 50-59 años	0.0-3.5 ng/ml
De 60-69 años	0.0-4.5 ng/ml
De 70-79 años	0.0-6.5 ng/ml

Respecto a los resultados obtenidos en nuestro ensayo (Figura 22), no observamos ningún cambio significativo ni en la PSA total ni en la libre ni en la fracción. En cualquier caso, tenemos que tener presente que todos que los individuos analizados tienen unos niveles de PSA inferiores a 4 µg/mL, por lo que están situados dentro de los valores de normalidad.

Sin embargo, si tenemos en cuenta aquellos individuos que están considerados de riesgo obtenemos que únicamente dos personas de la muestra han recibido un suplemento de aceite de oliva y que otro individuo ha recibido un suplemento de aceite de oliva enriquecido con licopeno. En estos casos (Figura 23, Figura 24), observamos un efecto positivo tanto del aceite virgen como del aceite enriquecido, aunque fue mayor en este último.

3. Análisis del consumo alimentario

De acuerdo a los datos obtenidos, la dieta seguida por los participantes en el estudio presenta los valores reflejados en la tabla 4 y en la tabla 5. Como se puede observar, la ingestión energética media de todos los participantes es de 1938,8 Kcal obtenidas a partir de un 46% de carbohidratos, un 17% de proteínas y un 37% de lípidos. Asimismo,

la media en la ingestión de fibra es de 16 g diarios, de colesterol 374 mg, de calcio 800 mg, de hierro 12.4 mg y de ácido fólico 373.73 µg. La grasa de la dieta procede en un 34% de los ácidos grasos saturados, en un 46.4% de los ácidos grasos poliinsaturados y en un 19.7% de los ácidos grasos monoinsaturados.

En el caso de las mujeres (n=56), la ingestión energética media fue de 1865 Kcal, proporcionadas por los carbohidratos en un 47%, las proteínas en un 14% y los lípidos en un 39%. En el caso de los varones (n=25), la ingestión energética media fue de 2012,6 Kcal, proporcionadas por los carbohidratos en un 46%, las proteínas en un 20% y los lípidos en un 34%. Todos estos datos pueden verse resumidos en la figuras 25, 26, 27 y 28.

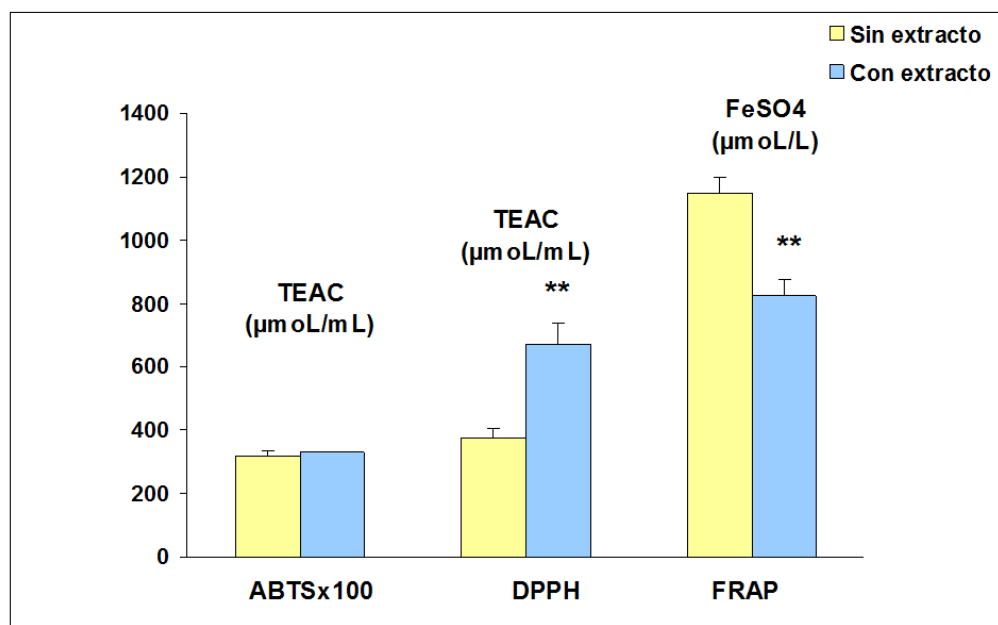
Tabla 4. Valoración nutricional de la dieta.

	Kcal	H. de C.	Lips	Prots	Fibra (g)	Col (mg)	AGS	AGMI	AGPI
mujeres (media)	1865,0	166,3	95,3	64,7	17,8	370,9	33,7	50,6	15,8
mujeres σ	441,9	54,6	24,5	20,5	6,8	108,9	23,3	32,9	13,4
varones (media)	2012,6	168,2	102	97,2	15,7	377,0	26,3	45,4	12,2
varones σ	384,5	45,3	21,5	20,9	4,7	89,9	8,6	11,8	3,88
Mujeres y varones (media)	1938,8	167,2	98,8	80,9	16,8	373,9	30	48	14

Tabla 5. Valoración nutricional de la dieta.

	Ca (mg)	Mg (mg)	Fe (mg)	D (µg)	B ₁₂ (µg)	Fol (µg)	C (mg)
mujeres, (media)	848,2	272,7	12,4	10,4	5,7	507,9	148,2
Mujeres, σ	288,1	72,9	3,8	10,7	2,1	275,5	71,9
varones, (media)	752,6	260,9	12,3	4,07	6,2	239,5	109,3
varones, σ	287,3	71,0	3,0	5,55	2,2	107,2	41,8
Mujeres y varones, (media)	800,4	266,8	12,4	7,24	5,9	373,7	128,7

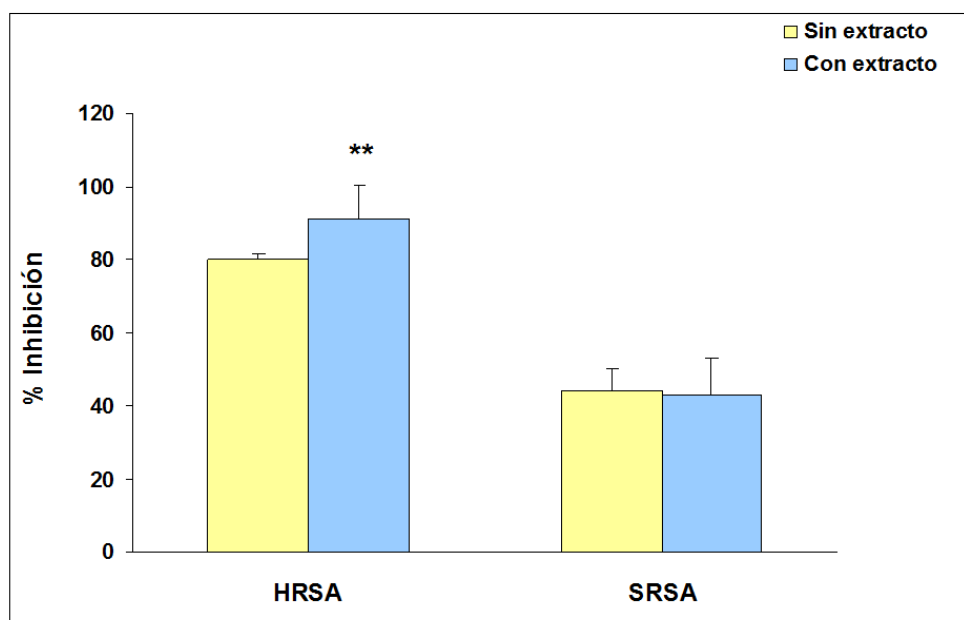
Figura 6. Capacidad antioxidante total en el aceite de oliva virgen sin/con extracto de tomate



Los resultados están expresados en media \pm SD de 5 experimentos diferentes. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

**P<0,005 y *P<0,05 – con extracto vs sin extracto.

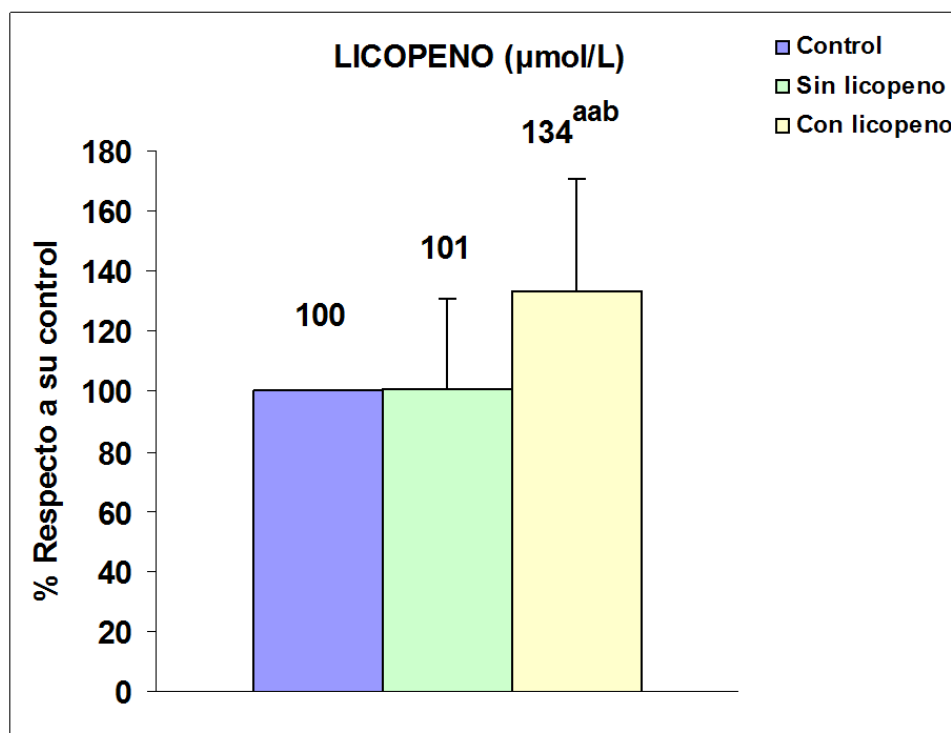
Figura 7. Actividad estabilizadora de radicales libres oxigénicos



Los resultados están expresados en media \pm SD de 5 experimentos diferentes. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

**P<0,005 y *P<0,05 – con extracto vs sin extracto

Figura 8. Niveles de licopeno en plasma en individuos que ingirieron aceite de oliva virgen y Aceiterol en el transcurso del estudio.

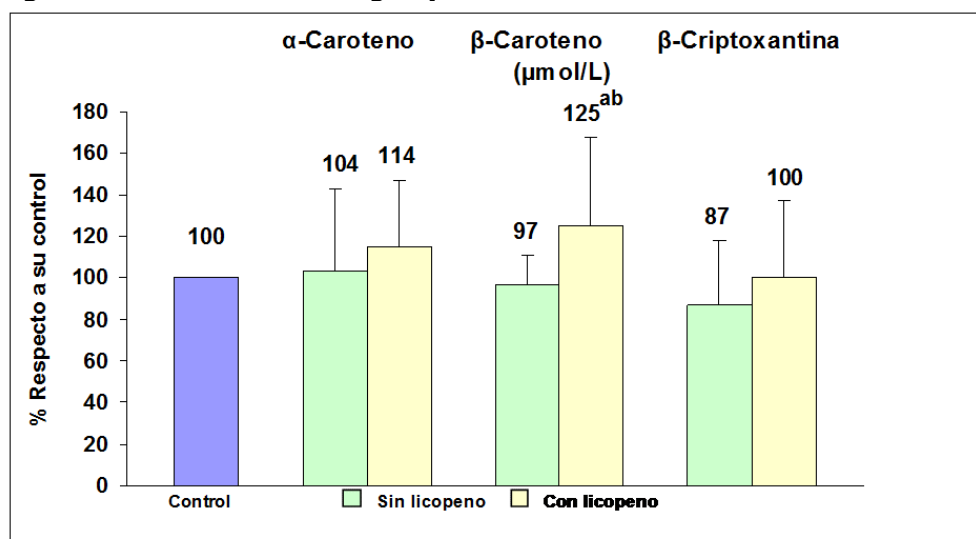


Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control.

^{bb}P<0,005 y ^bP<0,05 – con licopeno respecto a sin licopeno

Figura 9. Niveles de carotenos y criptoxantina en plasma en individuos que ingirieron aceite de oliva virgen y Aceiterol en el transcurso del estudio.

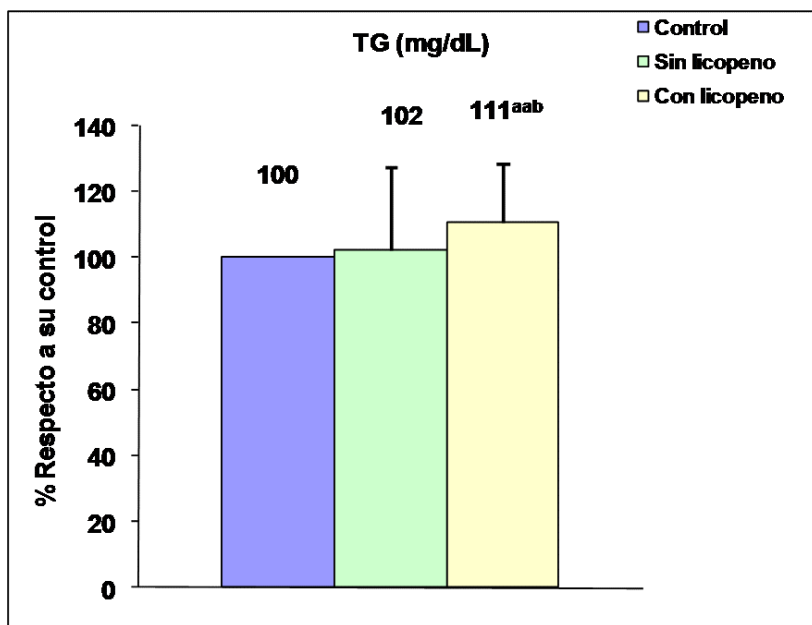


Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control.

^{bb}P<0,005 y ^bP<0,05 – con licopeno respecto a sin licopeno

Figura 10. Niveles de Triglicéridos en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.

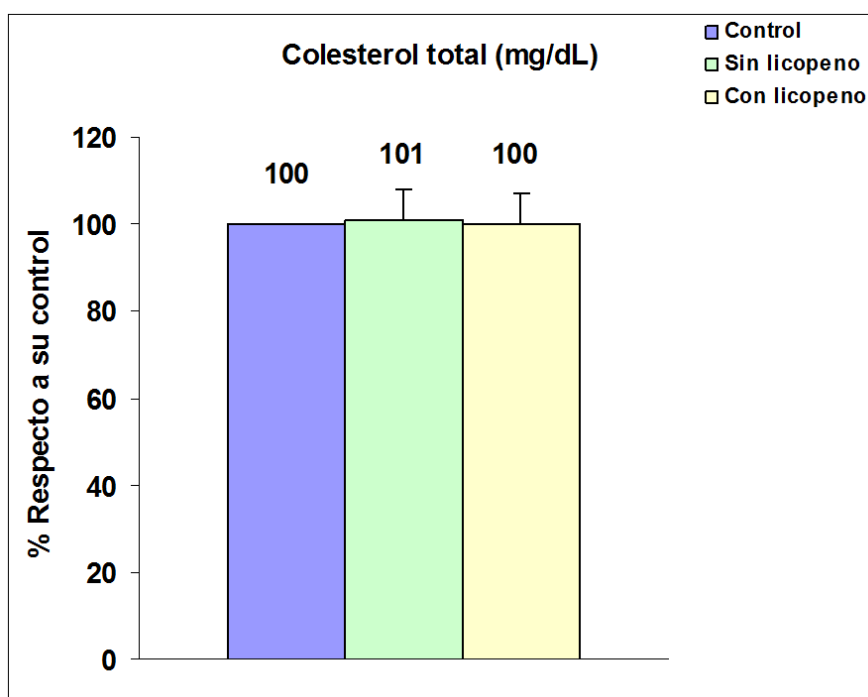


Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control.

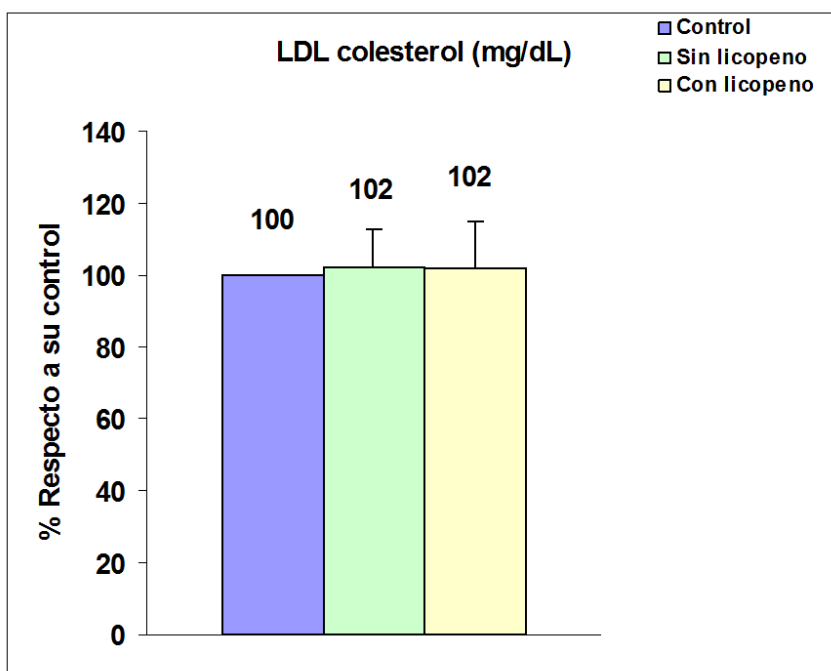
^{bb}P<0,005 y ^bP<0,05 – con licopeno respecto a sin licopeno

Figura 11. Niveles de Colesterol total en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



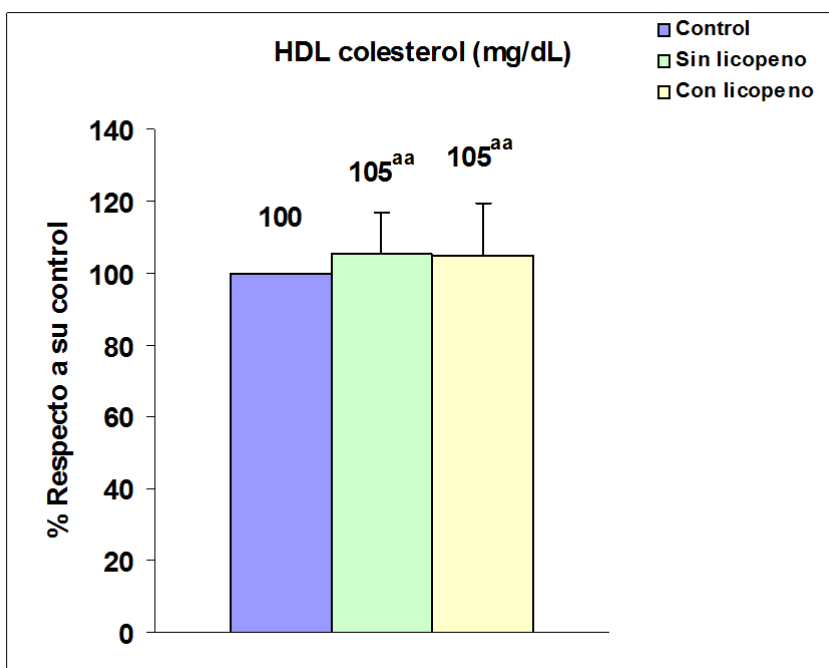
Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas). De 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

Figura 12. Niveles de LDL colesterol en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

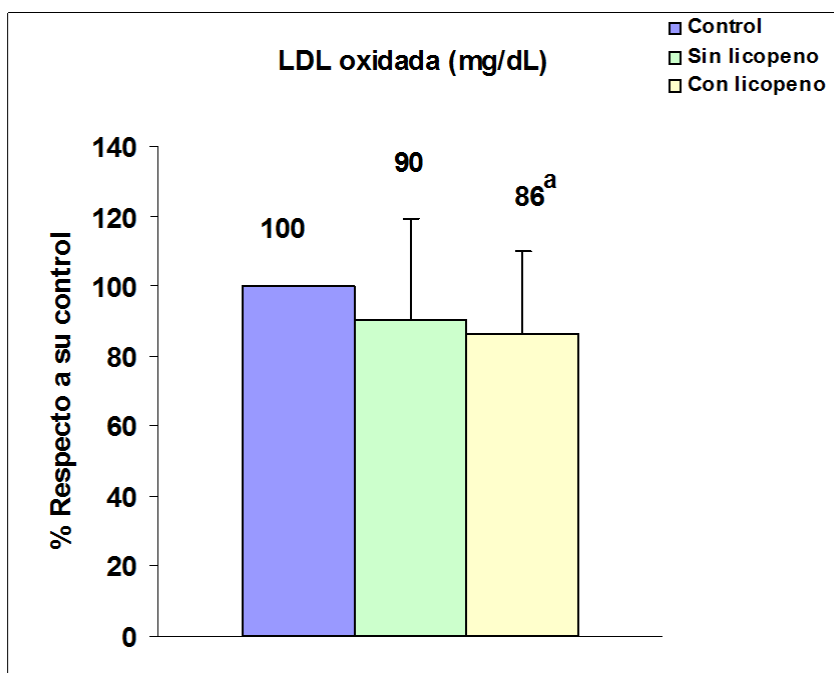
Figura 13. Niveles de HDL colesterol en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

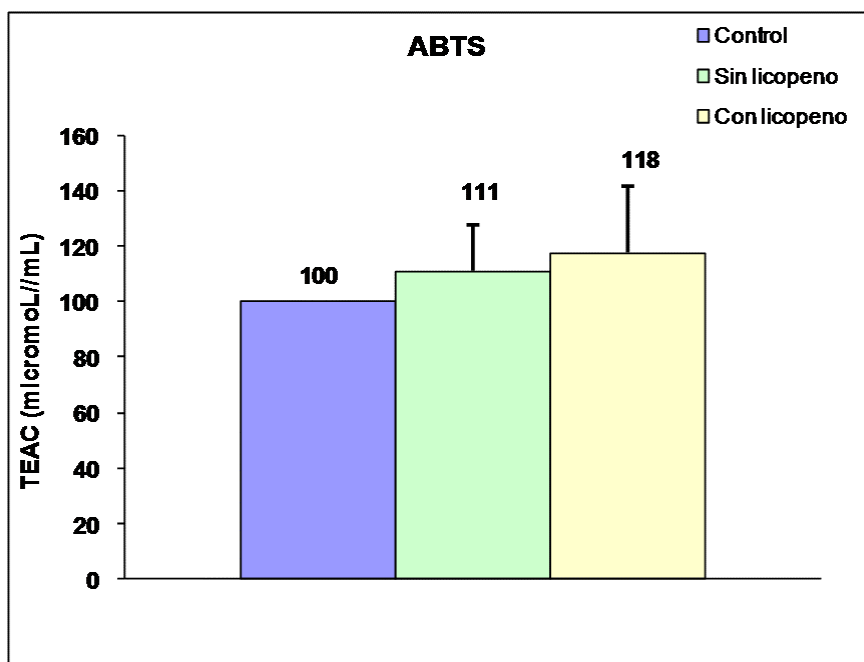
^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

Figura 14. Niveles de LDL oxidada en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



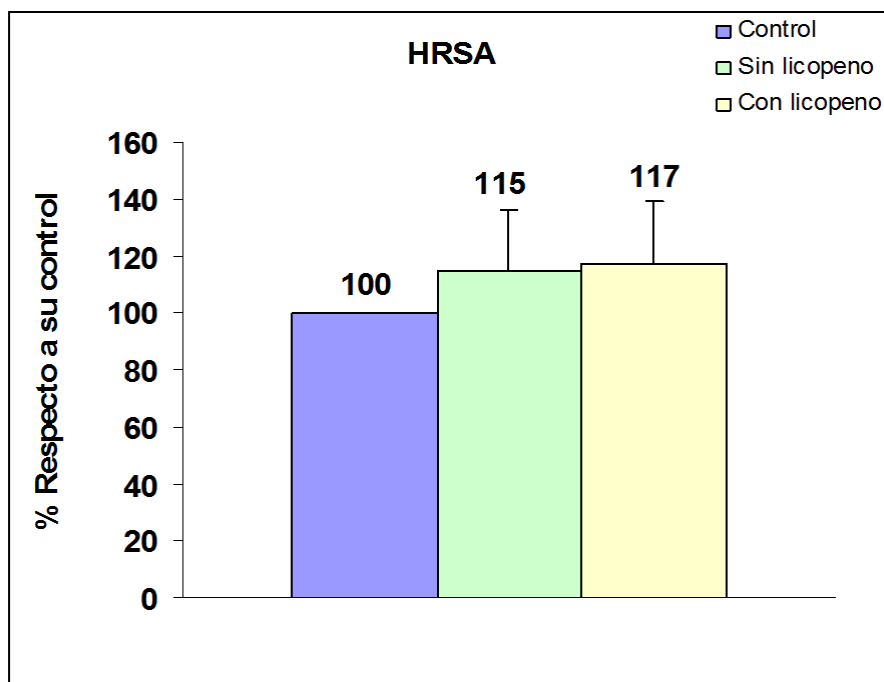
Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) de 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.
^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

Figura 15. Capacidad antioxidante total en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



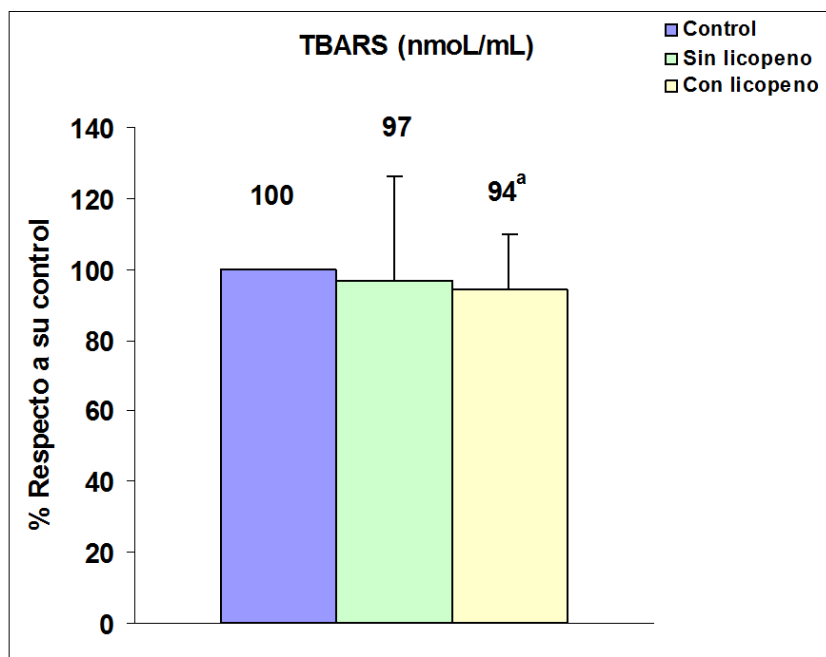
Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas). n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

Figura 16. Capacidad estabilizadora del radical hidroxilo en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas).
n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

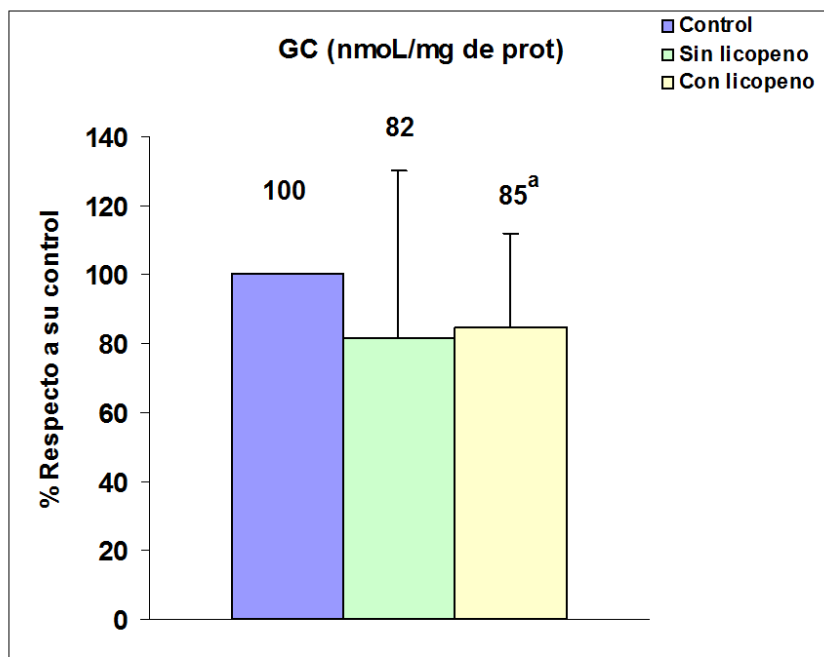
Figura 17. Niveles de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en individuos suplementados con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas)
n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

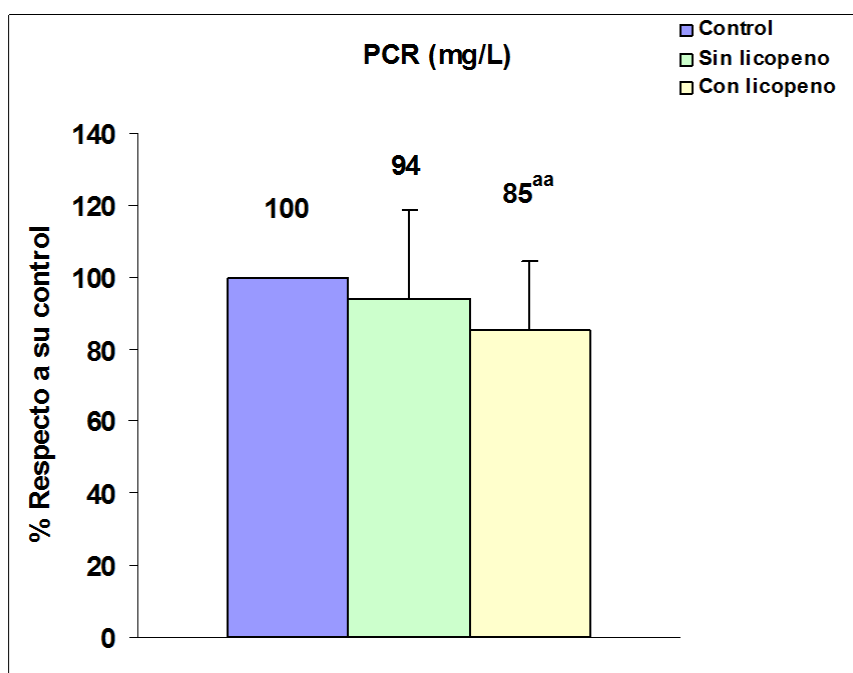
Figura 18. Contenido en grupos carbonilo de las proteínas (GC) en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas).
n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

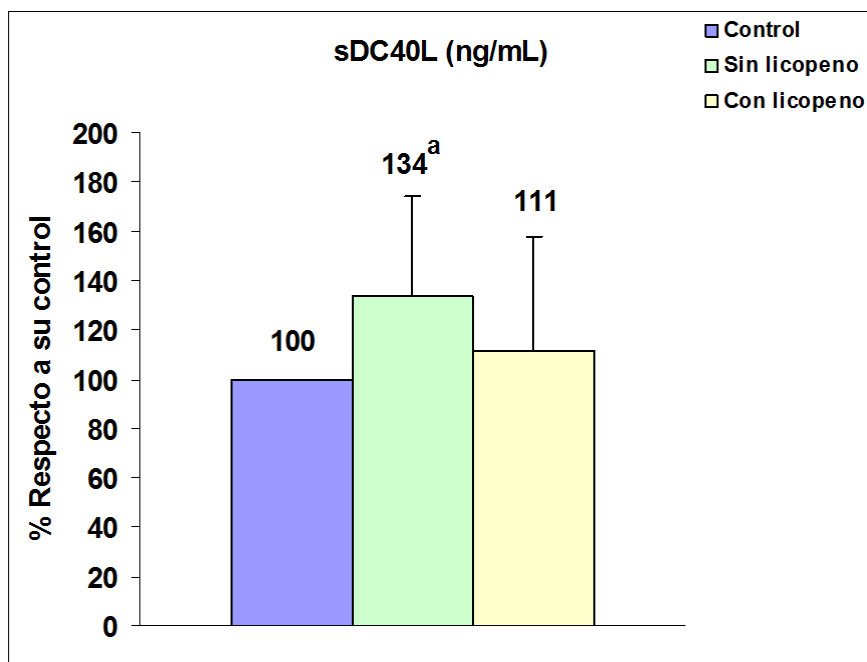
Figura 19. Niveles de la proteína C reactiva en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas).
n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

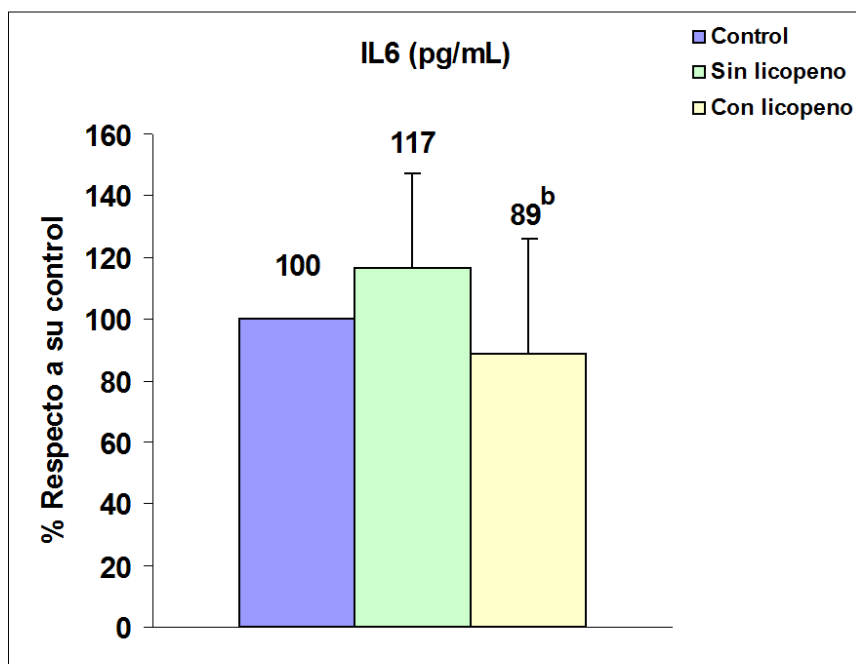
Figura 20. Niveles de sDC40L en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

^{aa}P<0,005 y ^aP<0,05 – sin y con licopeno respecto a su control

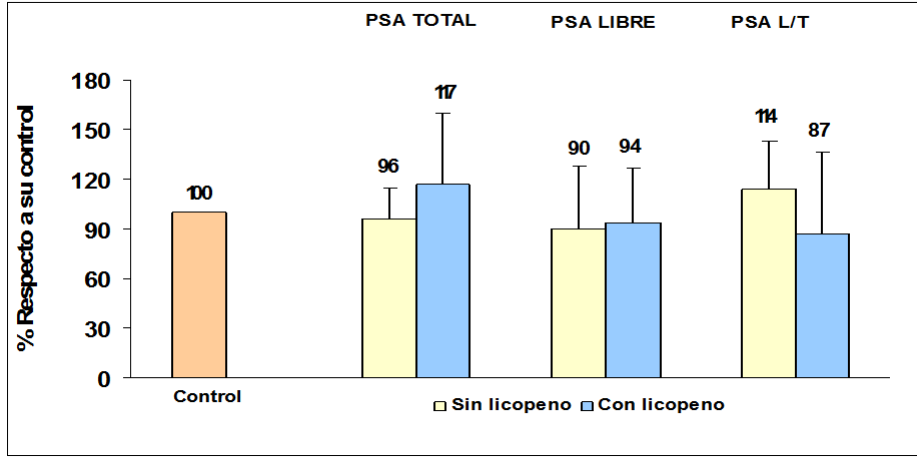
Figura 21. Niveles de la interleukina 6 (IL6) en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) n = 85 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

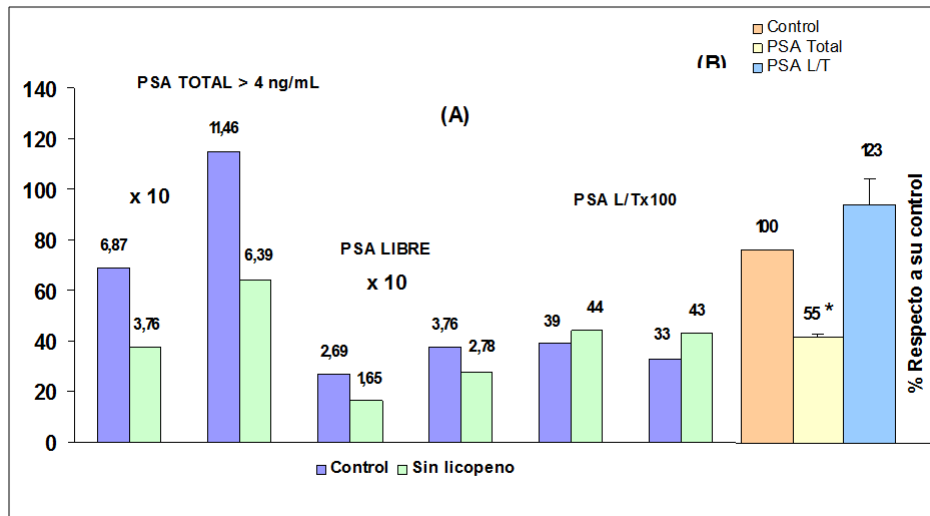
^{bb}P<0,005 y ^bP<0,05 – con licopeno respecto a sin licopeno

Figura 22. Niveles del antígeno prostático específico (PSA) total, libre y fracción en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin/con licopeno.



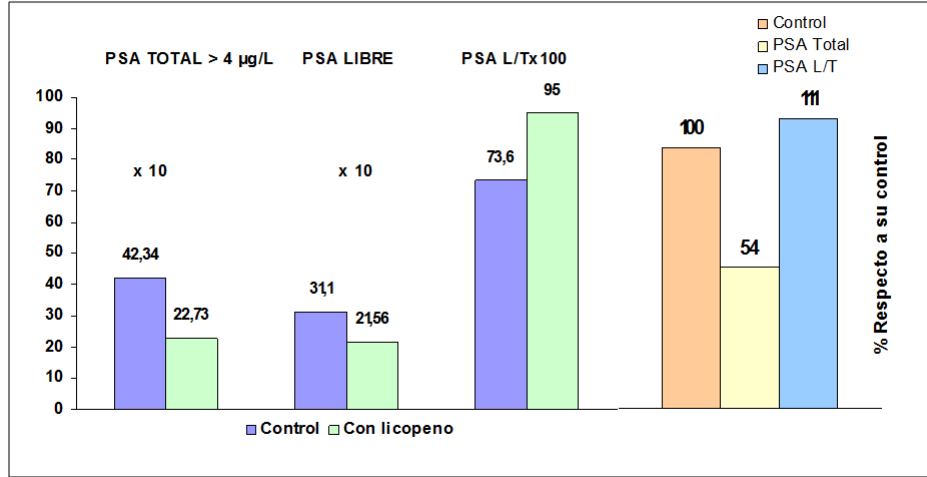
Los resultados están expresados en % respecto a su control (muestras apareadas) n = 22 individuos. Para los cálculos estadísticos se aplicó la t' Student.

Figura 23. Niveles del PSA total > de 4 µg/mL, libre y libre/total en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen sin licopeno



Los resultados corresponden a dos individuos (78 y 63 años respectivamente) cuyos niveles del PSA eran > de 4 ng/mL (A) y los porcentajes (muestras apareadas) respecto a su control (B)

Figura 24. Niveles del PSA total > a 4 µg/mL, libre y libre/total en individuos cuya dieta ha sido suplementada con aceite de oliva virgen con licopeno.



Los resultados corresponden a 1 individuo (75 años) cuyos niveles del PSA eran mayores de 4 ng/mL (A) y los porcentajes (muestras apareadas) respecto a su control (B)

Figura 25. Energía y su origen (%) ingerida por los participantes en el estudio: mujeres y varones.

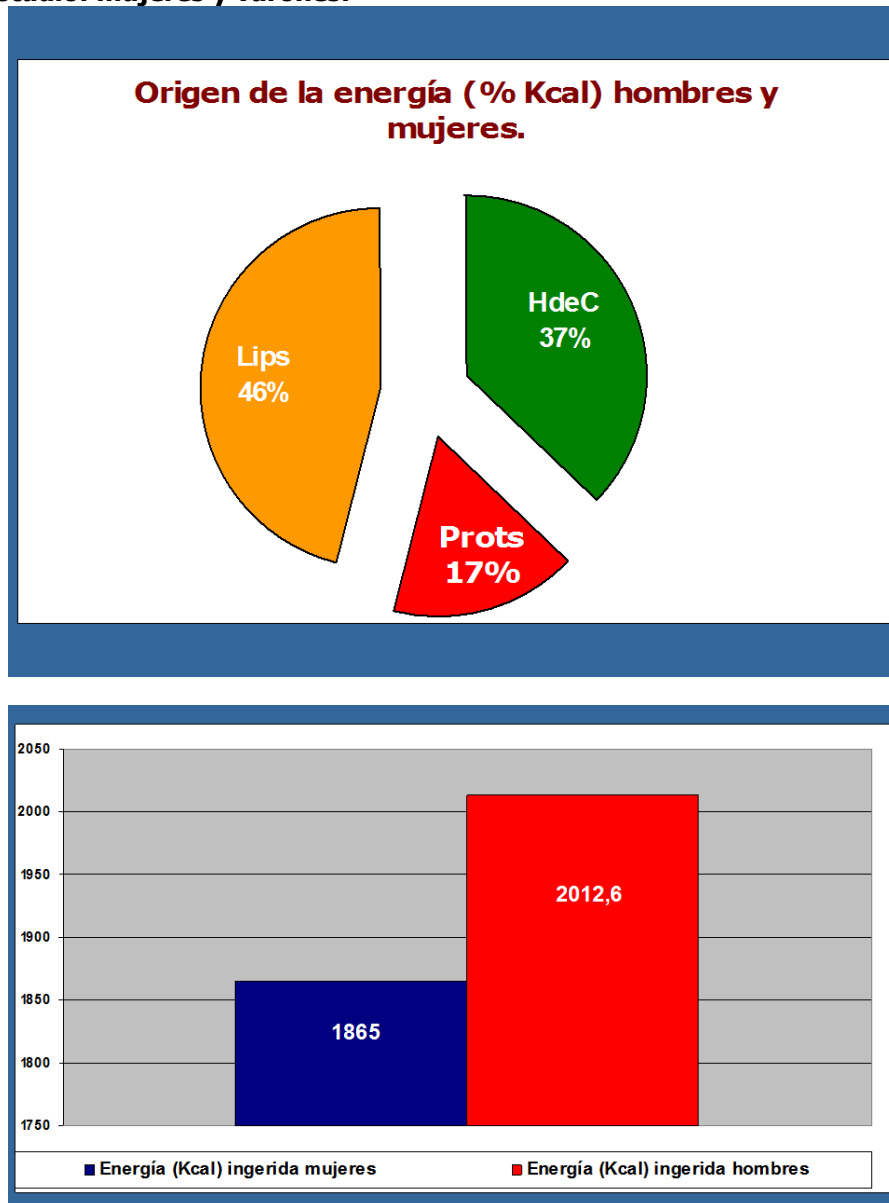


Figura 26. Origen de la energía (%) ingerida por los participantes en el estudio: mujeres.

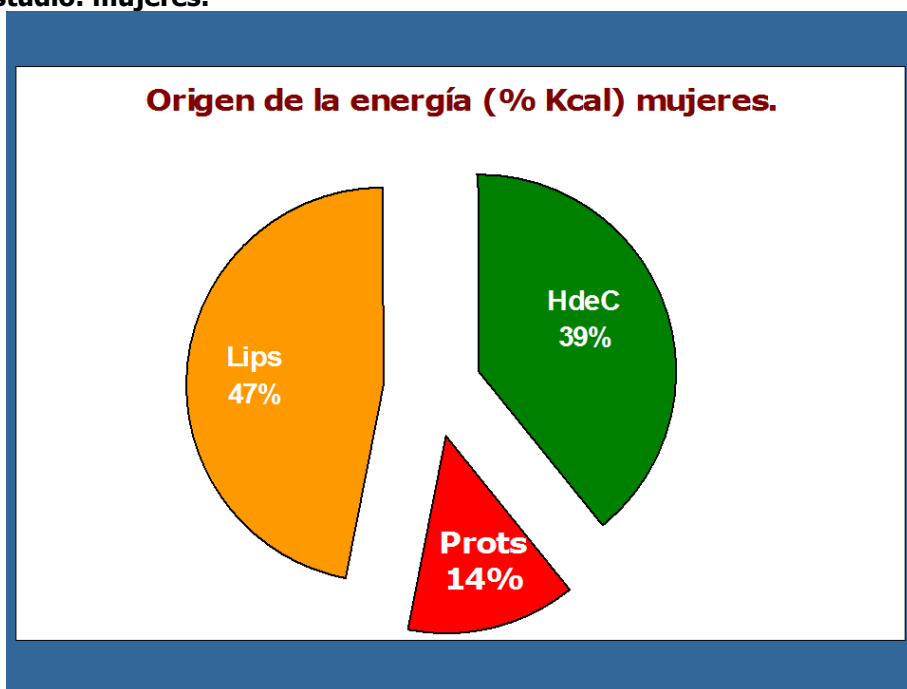


Figura 27. Origen de la energía (%) ingerida por los participantes en el estudio: varones.

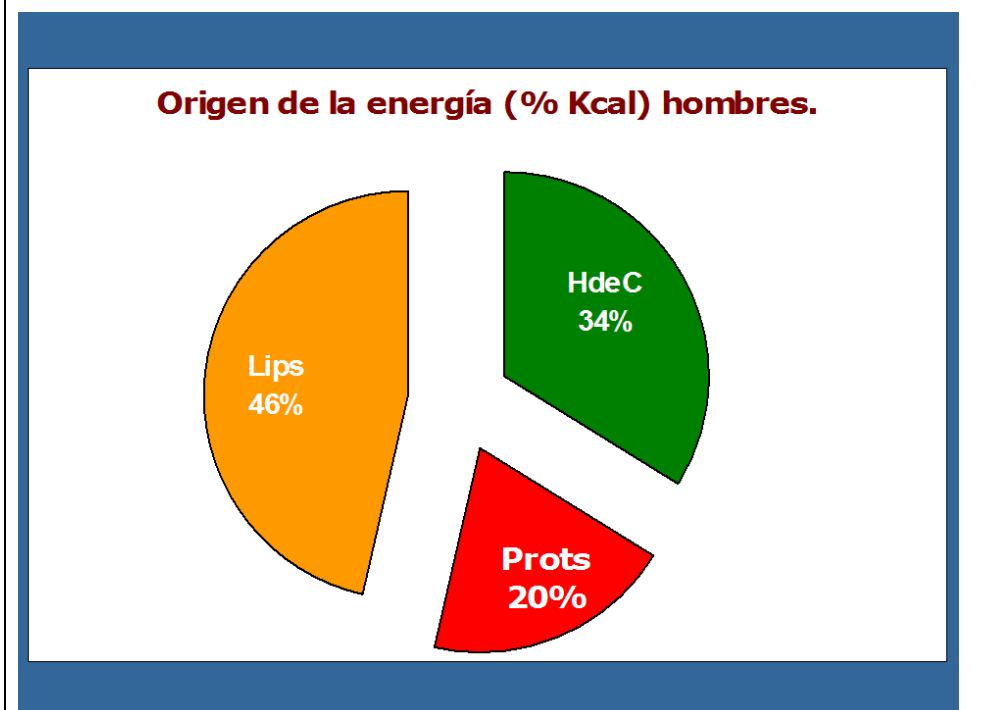
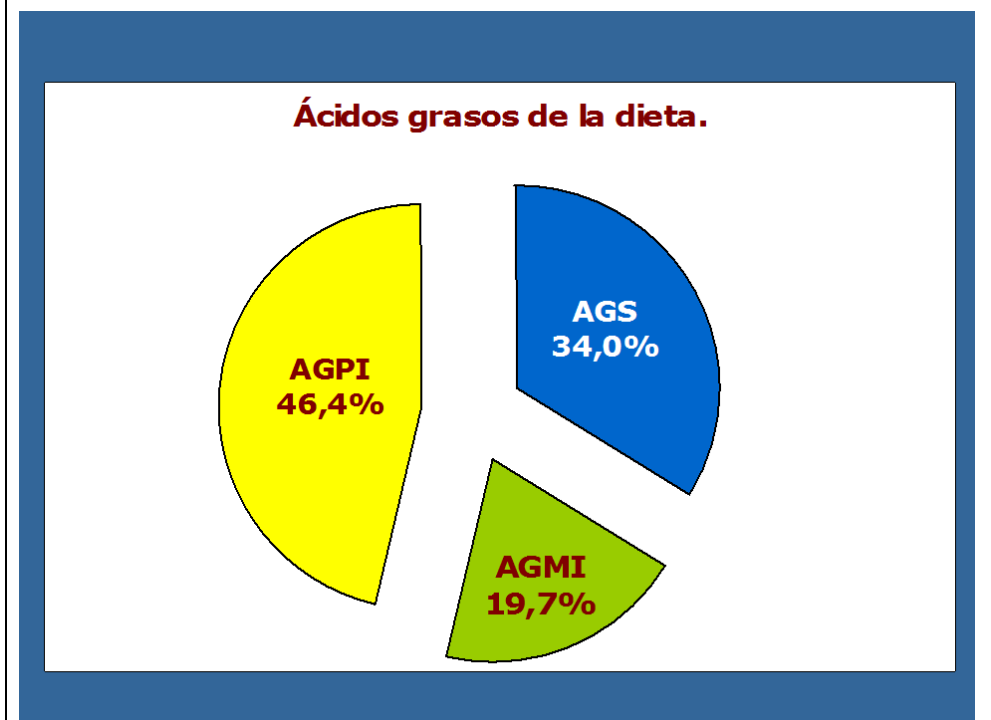


Figura 28. Presencia de ácidos grasos (%) en la dieta de los participantes en el estudio: mujeres y varones.



V. CONCLUSIONES.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se ha podido llegar a las conclusiones que se señalan a continuación:

- 1.** El licopeno contenido en Aceiterol[®] es absorbido por los sujetos del estudio, pudiendo detectarse su concentración variable en el plasma de forma dosis dependiente.
- 2.** Aceiterol[®] posee una capacidad antioxidante que se refleja en el plasma de los sujetos del estudio y que es cuantificable.
- 3.** Los triglicéridos de los sujetos del estudio se ven aumentados tras la ingestión de Aceiterol[®], probablemente por otros factores dietéticos no controlados en el trabajo.
- 4.** No se encuentra un efecto significativo de Aceiterol[®] sobre los niveles sanguíneos de colesterol total ni de LDL-colesterol.
- 5.** Existe un efecto moderado de Aceiterol[®] sobre las concentraciones plasmáticas de HDL-colesterol que es similar al producido tras la ingestión de aceite de oliva virgen.
- 6.** Las lipoproteínas oxidadas LDL-colesterol disminuyen su concentración tras la ingestión de Aceiterol[®], lo que podría suponer un beneficio cardiovascular.
- 7.** Aceiterol[®] potencia la defensa antioxidante de los individuos que lo ingirieron disminuyendo su estrés oxidativo.
- 8.** Aceiterol[®] mejora los parámetros de inflamación analizados tras su ingestión.
- 9.** No es posible llegar a conclusiones del efecto de Aceiterol[®] sobre la producción de antígeno prostático específico con los pacientes y condiciones del estudio.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahuja KD, Pittaway JK, Ball MJ. Effects of olive oil and tomato lycopene combination on serum lycopene, lipid profile, and lipid oxidation. *Nutrition*. 2006 Mar;22(3):259-65. Epub 2006 Jan 18.
- Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009 Jan 15:1-9. [Epub ahead of print]
- Ansari MS, Ansari S. Lycopene and prostate cancer. *Future Oncol*. 2005 Jun;1(3):425-30.
- Ansari MS, Gupta NP. Lycopene: a novel drug therapy in hormone refractory metastatic prostate cancer. *Urol Oncol*. 2004 Sep-Oct;22(5):415-20.
- Bansal P, Gupta SK, Ojha SK, Nandave M, Mittal R, Kumari S, Arya DS. Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 2006 Sep;289(1-2):1-9. Epub 2006 Apr 7.
- Basu A, Imrhan V. Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *Eur J Clin Nutr*. 2007 Mar;61(3):295-303. Epub 2006 Aug 16.
- Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996 (239):70-76.
- Bessler H, Salman H, Bergman M, Alcalay Y, Djaldetti M. In vitro effect of lycopene on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Invest*. 2008;37(3):183-90.
- Bose KS, Agrawal BK. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Med J*. 2007 May;48(5):415-20.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology* 1995 (28):25-30.
- Brigelius, R., Muckel, C., Ackerboom, T.P.M., Sies, H. (1983) Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulphides and its relation to glutathione disulphide. *Biochem. Pharmacol*. 32, 2529-2534.
- Bugianesi R, Salucci M, Leonardi C, Ferracane R, Catasta G, Azzini E, Maiani G. Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. *Eur J Nutr*. 2004 Dec;43(6):360-6. Epub 2004 Apr 5.
- Bunker CH, McDonald AC, Evans RW, de la Rosa N, Boumosleh JM, Patrick AL. A randomized trial of lycopene supplementation in Tobago men with high prostate cancer risk. *Nutr Cancer*. 2007;57(2):130-7.
- Burgess LC, Rice E, Fischer T, Seekins JR, Burgess TP, Sticka SJ, Klatt K.
- Burri BJ, Chapman MH, Neidlinger TR, Seo JS, Ishida BK. Tangerine tomatoes increase total and tetra-cis-lycopene isomer concentrations more than red tomatoes in healthy adult humans. *Int J Food Sci Nutr*. 2008 Apr 10:1-16. [Epub ahead of print]
- Cardinault N, Abalain JH, Sairafi B, Coudray C, Grolier P, Rambeau M, Carré JL, Mazur A, Rock E. Lycopene but not lutein nor zeaxanthin decreases in serum and lipoproteins in age-related macular degeneration patients. *Clin Chim Acta*. 2005 Jul 1;357(1):34-42.
- Chandra RV, Prabhuji ML, Roopa DA, Ravirajan S, Kishore HC. Efficacy of lycopene in the treatment of gingivitis: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Oral Health Prev Dent*. 2007;5(4):327-36.
- Collins JK, Arjmandi BH, Claypool PL, Perkins-Veazie P, Baker RA, Clevidence BA. Lycopene from two food sources does not affect antioxidant or cholesterol status of middle-aged adults. *Nutr J*. 2004 Sep 15;3:15.
- Darvin M, Patzelt A, Gehse S, Schanzer S, Benderoth C, Sterry W, Lademann J. Cutaneous concentration of lycopene correlates significantly with the roughness of the skin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008 Aug;69(3):943-7. Epub 2008 Feb 13.
- Das S, Otani H, Maulik N, Das DK. Lycopene, tomatoes, and coronary heart disease. *Free Radic Res*. 2005 Apr;39(4):449-55.
- Denniss SG, Haffner TD, Kroetsch JT, Davidson SR, Rush JW, Hughson RL. Effect of short-term lycopene supplementation and postprandial dyslipidemia on plasma antioxidants and biomarkers of endothelial health in young, healthy individuals. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(1):213-22.
- Devaraj S, Mathur S, Basu A, Aung HH, Vasu VT, Meyers S, Jialal I. A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *J Am Coll Nutr*. 2008 Apr;27(2):267-73.
- Ellinger S, Ellinger J, Müller SC, Stehle P. Tomatoes and lycopene in prevention and therapy--is there an evidence for prostate diseases? *Aktuelle Urol*. 2009 Jan;40(1):37-43. Epub 2009 Jan 28.
- Ellinger S, Ellinger J, Stehle P. Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer: do we have the evidence from intervention studies? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006 Nov;9(6):722-7.

- Erdman JW Jr, Ford NA, Lindshield BL. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Arch Biochem Biophys*. 2008 Nov 1. [Epub ahead of print]
- Etminan M, Takkouche B, Caamaño-Isorna F. The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Mar;13(3):340-5.
- Fielding JM, Rowley KG, Cooper P, O' Dea K. Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005;14(2):131-6.
- Food and drug administration. FDA Allows Qualified Health Claim to Decrease Risk of Coronary Heart Disease. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html> [accedido en marzo de 2009]
- Fraser ML, Lee AH, Binns CW. Lycopene and prostate cancer: emerging evidence. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2005 Oct;5(5):847-54.
- Fröhlich K, Kaufmann K, Bitsch R, Böhm V. Effects of ingestion of tomatoes, tomato juice and tomato purée on contents of lycopene isomers, tocopherols and ascorbic acid in human plasma as well as on lycopene isomer pattern. *Br J Nutr*. 2006 Apr;95(4):734-41.
- Gómez-Candela C. Guía visual de alimentos y raciones. Editores médicos. Madrid, 2007.
- Goñi I, Serrano J, Saura-Calixto F. Bioaccessibility of beta-carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem*. 2006 Jul 26;54(15):5382-7.
- Gould AL et al. Cholesterol Reduction Yields Clinical Benefit: Impact of Statin Trials. *Circulation* 1998; 97: 946-952.
- Goyal A, Chopra M, Lwaleed BA, Birch B, Cooper AJ. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. *BJU Int*. 2007 Jun;99(6):1456-60. Epub 2007 Mar 2.
- Granado F, Olmedilla B. Risk assessment of lutein and lycopene. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007 Apr;47(3):327-8; author reply 329. Epub 2006 Nov 28.
- Gunasekera RS, Sewgobind K, Desai S, Dunn L, Black HS, McKeenan WL, Patil B. Lycopene and lutein inhibit proliferation in rat prostate carcinoma cells. *Nutr Cancer*. 2007;58(2):171-7.
- Guns ES, Cowell SP. Drug Insight: lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2005 Jan;2(1):38-43.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Aruoma, O.I. The deoxyribose method: a simple "test Tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 1987, 165, 215-219.
- Hirsch K, Atzmon A, Danilenko M, Levy J, Sharoni Y. Lycopene and other carotenoids inhibit estrogenic activity of 17beta-estradiol and genistein in cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Aug;104(2):221-30. Epub 2006 Oct 19.
- Hsiao G, Wang Y, Tzu NH, Fong TH, Shen MY, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Inhibitory effects of lycopene on in vitro platelet activation and in vivo prevention of thrombus formation. *J Lab Clin Med*. 2005 Oct;146(4):216-26.
- Hu MY, Li YL, Jiang CH, Liu ZQ, Qu SL, Huang YM. Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition*. 2008 Oct;24(10):1030-8. Epub 2008 Jun 30.
- Huang CS, Liao JW, Hu ML. Lycopene inhibits experimental metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells in athymic nude mice. *J Nutr*. 2008 Mar;138(3):538-43.
- Hung CF, Huang TF, Chen BH, Shieh JM, Wu PH, Wu WB. Lycopene inhibits TNF-alpha-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 31;586(1-3):275-82. Epub 2008 Mar 13.
- Jacob K, Periago MJ, Böhm V, Berruezo GR. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Br J Nutr*. 2008 Jan;99(1):137-46. Epub 2007 Jul 19.
- Jatoi A, Burch P, Hillman D, Vanyo JM, Dakhil S, Nikcevic D, Rowland K, Morton R, Flynn PJ, Young C, Tan W; North Central Cancer Treatment Group. A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: results of a Phase II study from the North Central Cancer Treatment Group. *Urology*. 2007 Feb;69(2):289-94.
- Jian L, Du CJ, Lee AH, Binns CW. Do dietary lycopene and other carotenoids protect against prostate cancer? *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):1010-4.
- Jian L, Lee AH, Binns CW. Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16 Suppl 1:453-7.
- Kavanaugh CJ, Trumbo PR, Ellwood KC. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Jul 18;99(14):1074-85. Epub 2007 Jul 10.
- Kerr AR. Efficacy of oral lycopene in the management of oral submucous fibrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Feb;103(2):214-5.
- King-Batoon A, Leszczynska JM, Klein CB. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ Mol Mutagen*. 2008 Jan;49(1):36-45.
- Kirsh VA, Mayne ST, Peters U, Chatterjee N, Leitzmann MF, Dixon LB, Urban DA, Crawford ED, Hayes RB. A prospective study of lycopene and tomato product intake and risk of prostate cancer.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Jan;15(1):92-8.
- Kuhad A, Sethi R, Chopra K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci*. 2008 Jul 18;83(3-4):128-34. Epub 2008 Jun 8.
- Levine, R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shatiel, S. And Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 186: 466-478.
- Limpens J, Schröder FH, de Ridder CM, Bolder CA, Wildhagen MF, Obermüller-Jevic UC, Krämer K, van Weerden WM. Combined lycopene and vitamin E treatment suppresses the growth of PC-346C human prostate cancer cells in nude mice. *J Nutr*. 2006 May;136(5):1287-93.
- Lindshield BL, Canene-Adams K, Erdman JW Jr. Lycopene: are lycopene metabolites bioactive? *Arch Biochem Biophys*. 2007 Feb 15;458(2):136-40. Epub 2006 Oct 4.
- Liu X, Allen JD, Arnold JT, Blackman MR. Lycopene inhibits IGF-I signal transduction and growth in normal prostate epithelial cells by decreasing DHT-modulated IGF-I production in co-cultured reactive stromal cells. Seren S, Lieberman R, Bayraktar UD, Heath E, Sahin K, Andic F, Kucuk O. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther*. 2008 Jan-Feb;15(1):66-81. *Carcinogenesis*. 2008 Apr;29(4):816-23. Epub 2008 Feb 17.
- Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and noncancerous) in an in vitro system with doses across the physiological range. *Toxicol In Vitro*. 2008 Aug;22(5):1297-300. Epub 2008 Mar 14.
- Markovitch D, Tyrrell RM, Tauler P, Frystyk J, Stokes K, Thompson D. Lycopene supplementation (passata sauce) reduces apoptosis but does not affect oxidant-responsive heme oxygenase-1 in human lymphocytes. *Nutrition*. 2009 Jan 2. [Epub ahead of print]
- Mein JR, Lian F, Wang XD. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *Nutr Rev*. 2008 Dec;66(12):667-83.
- Miller N.J. and Rice-Evans C.A. (1997) Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS^{•+} Radical Cation Assay. *Free Rad. Res*. 26, 195-199.
- Mohanty NK, Saxena S, Singh UP, Goyal NK, Arora RP. Lycopene as a chemopreventive agent in the treatment of high-grade prostate intraepithelial neoplasia. *Urol Oncol*. 2005 Nov-Dec;23(6):383-5.
- Muñiz, P., Valls V., Perez-Broseta, C., Iradi, A.; Climent JV., Oliva, MR, Saez GT. The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol. Med* 1995; 18: 747-755.
- Napolitano M, De Pascale C, Wheeler-Jones C, Botham KM, Bravo E. Effects of lycopene on the induction of foam cell formation by modified LDL. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Dec;293(6):E1820-7. Epub 2007 Oct 2.
- Neyestani TR, Shariatzadeh N, Gharavi A, Kalayi A, Khalaji N. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. *J Endocrinol Invest*. 2007 Nov;30(10):833-8.
- Nkondjock A, Ghadirian P, Johnson KC, Krewski D; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk. *J Nutr*. 2005 Mar;135(3):592-7.
- Palozza P, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Böhm V, Fröhlich K, Mele MC, Monego G, Ranelletti FO. Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *J Nutr Biochem*. 2009 Jan 19. [Epub ahead of print]
- Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology & Medicine* 1999(26): 1231-1237
- Plaza Pérez et al. Control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 815 - 837.
- Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food Nutr Res*. 2006;51:99-164.
- Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2007 Jan;18(1):109-15. Epub 2006 Aug 29.
- Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, Della Vecchia R, D'Orazio N. Plasma lycopene and antioxidant vitamins in asthma: the PLAVA study. *J Asthma*. 2007 Jul-Aug;44(6):429-32.
- Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, Di Ilio C, D'Orazio N. Plasma lycopene concentration is low in subjects with stable asthma. *Allergy*. 2006 Nov;61(11):1371-2.
- Riccioni G, Mancini B, Di Ilio E, Bucciarelli T, D'Orazio N. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2008 May-Jun;12(3):183-90.
- Riso P, Visioli F, Erba D, Testolin G, Porrini M. Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr*. 2004 Oct;58(10):1350-8.
- Sahni S, Hannan MT, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, Tucker KL. Protective Effect of Total Carotenoid and Lycopene Intake on the Risk of Hip Fracture: A 17-Year Follow-Up From the Framingham

- Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2009 Jan 12. [Epub ahead of print]
- Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother.* 2007 Jul;61(6):366-9. Epub 2007 Mar 19.
- Sánchez-Chaparro et al. Prevalencia de Factores de Riesgo Vascular en la población laboral española. *Rev. Esp. Cardiol.* 2006; 59:421-430.
- Santos MT, Valle J., Azmar T. Valoración espectrofotométrica del MDA plasmático basal. *Rev Diag Biol* 1980(1): 57-59.
- Satia JA, Littman A, Slatore CG, Galanko JA, White E. Long-term Use of β -Carotene, Retinol, Lycopene, and Lutein Supplements and Lung Cancer Risk: Results From the VITamins And Lifestyle (VITAL) Study. *Am J Epidemiol.* 2009 Feb 10. [Epub ahead of print]
- Schwarz S, Obermüller-Jevic UC, Hellmis E, Koch W, Jacobi G, Biesalski HK. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. *J Nutr.* 2008 Jan;138(1):49-53.
- Schwenke C, Ubrig B, Thürmann P, Eggersmann C, Roth S. Lycopene for Advanced Hormone Refractory Prostate Cancer: A Prospective, Open Phase II Pilot Study. *J Urol.* 2009 Jan 14. [Epub ahead of print]
- Seren S, Mutchnick M, Hutchinson D, Harmanci O, Bayraktar Y, Mutchnick S, Sahin K, Kucuk O. Potential role of lycopene in the treatment of hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. *Nutr Cancer.* 2008;60(6):729-35.
- Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, Gaziano JM. Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in men. *Am J Clin Nutr.* 2005 May;81(5):990-7.
- Sesso HD, Buring JE, Zhang SM, Norkus EP, Gaziano JM. Dietary and plasma lycopene and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 May;14(5):1074-81.
- Shao A, Hathcock JN. Risk assessment for the carotenoids lutein and lycopene. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006 Aug;45(3):289-98. Epub 2006 Jun 30.
- Singh M, Krishanappa R, Bagewadi A, Keluskar V. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2004 Jul;40(6):591-6.
- Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR, Menon VP. Lycopene as a natural protector against gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1770(4):659-65. Epub 2006 Nov 23.
- Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE. Role of lycopene and tomato products in prostate health. *Biochim Biophys Acta.* 2005 May 30;1740(2):202-5. Epub 2005 Mar 13.
- Stacey, N., and Priestly, B.G. (1978) Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes relationship to toxicity of and diethyl maleate. *Tox. Appl. Pharmacol.* 45, 41-48.
- Stahl W, Heinrich U, Aust O, Tronnier H, Sies H. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. *Photochem Photobiol Sci.* 2006 Feb;5(2):238-42. Epub 2005 Aug 12.
- Talwar D, Ha TK, Cooney J, et al (1998). A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clinical Chimica,* 1998; 270:85-100.
- Tang FY, Cho HJ, Pai MH, Chen YH. Concomitant supplementation of lycopene and eicosapentaenoic acid inhibits the proliferation of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem.* 2008 Aug 15. [Epub ahead of print]
- Tang FY, Shih CJ, Cheng LH, Ho HJ, Chen HJ. Lycopene inhibits growth of human colon cancer cells via suppression of the Akt signaling pathway. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Jun;52(6):646-54.
- Terry KL, Missmer SA, Hankinson SE, Willett WC, De Vivo I. Lycopene and other carotenoid intake in relation to risk of uterine leiomyomata. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Jan;198(1):37.e1-8. Epub 2007 Nov 5.
- Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs rats during aging. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(9): 1477-148.
- Unlu NZ, Bohn T, Francis DM, Nagaraja HN, Clinton SK, Schwartz SJ. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *Br J Nutr.* 2007 Jul;98(1):140-6. Epub 2007 Mar 29.
- Vaishampayan U, Hussain M, Banerjee M, Seren S, Sarkar FH, Fontana J, Forman JD, Cher ML, Powell I, Pontes JE, Kucuk O. Lycopene and soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutr Cancer.* 2007;59(1):1-7.
- van Breemen RB, Pajkovic N. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Lett.* 2008 Oct 8;269(2):339-51. Epub 2008 Jun 27.
- Veeramachaneni S, Ausman LM, Choi SW, Russell RM, Wang XD. High dose lycopene supplementation increases hepatic cytochrome P450E1 protein and inflammation in alcohol-fed rats. *J Nutr.* 2008 Jul;138(7):1329-35.
- Voskuil DW, Vrieling A, Korse CM, Beijnen JH, Bonfrer JM, van Doorn J, Kaas R, Oldenburg HS, Russell NS, Rutgers EJ, Verhoef S, van Leeuwen FE, van't Veer LJ, Rookus MA. Effects of lycopene on the insulin-like growth factor (IGF) system in premenopausal breast cancer survivors and women at high familial breast cancer risk. *Nutr Cancer.* 2008;60(3):342-53.

Vrieling A, Voskuil DW, Bonfrer JM, Korse CM, van Doorn J, Cats A, Depla AC, Timmer R, Witteman BJ, van Leeuwen FE, Van't Veer LJ, Rookus MA, Kampman E. Lycopene supplementation elevates circulating insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 concentrations in persons at greater risk of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr.* 2007 Nov;86(5):1456-62.

Walfisch S, Walfisch Y, Kirilov E, Linde N, Mnitentag H, Agbaria R, Sharoni Y, Levy J. Tomato lycopene extract supplementation decreases insulin-like growth factor-I levels in colon cancer patients. *Eur J Cancer Prev.* 2007 Aug;16(4):298-303.

Wane D, Lengacher CA. Integrative review of lycopene and breast cancer. *Oncol Nurs Forum.* 2006 Jan 1;33(1):127-37.

Wang L, Liu S, Manson JE, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. The consumption of lycopene and tomato-based food products is not associated with the risk of type 2 diabetes in women. *J Nutr.* 2006 Mar;136(3):620-5.

Wertz K, Siler U, Goralczyk R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Oct 1;430(1):127-34.

Wood LG, Garg ML, Powell H, Gibson PG. Lycopene-rich treatments modify noneosinophilic airway inflammation in asthma: proof of concept. *Free Radic Res.* 2008 Jan;42(1):94-102.

