

ALBUMIN AND TRANSFERRIN ARE ANTIOXIDANTS THAT PREVENT LIPOPEROXIDATION *IN VITRO*

LÓPEZ-RODRÍGUEZ GUADALUPE, SUÁREZ-DIEGUEZ TEODORO

(Received Agosto 2010; Accepted December 2010)

ABSTRACT

In humans, the antioxidant capacity assessment (CA) represents the sum of all the antioxidants contained in the biological sample, so the results can not be discussed according to the type of *molecule* responsible for CA. For this reason, we evaluated the *in vitro* CA protein, vitamins and enzymes in a mixture of polyunsaturated fatty acids undergo a Fenton reaction, where were tested physiological concentrations β -carotene, γ and α tocopherol, ascorbic acid, albumin, transferrin, superoxide dismutase, catalase, glutathione and glutathione peroxidase. We quantified the amount of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) produced in each reaction which was compared with a control sample. Tocopherols α and γ decreased TBARS $24.9 \pm 3.0\%$ and $23.0 \pm 2.2\%$ respectively, $p < 0.01$; the apo-transferrin show the best CA ($-71.5 \pm 1.7\%$, $p < 0.01$) followed by albumin ($-52.3 \pm 1.7\%$, $p < 0.01$), the antioxidant effect observed in the albumin affected its structure, identifying in agarose gel low molecular weight peptides. The results indicate that as tocopherols, albumin and transferrin are antioxidants prevent *in vitro* oxidation of polyunsaturated fatty acid exposed to a Fenton reaction.

Keywords: polyunsaturated fatty acid, lipid peroxidation, antioxidant capacity, TBARS.

RESUMEN

En humanos, la evaluación de la capacidad antioxidante (CA) representa la suma de todos los antioxidantes contenidos en la muestra biológica, por lo que los resultados no pueden ser discutidos de acuerdo al tipo de molécula responsable de la CA. Por esta razón, se evaluó *in vitro* la CA de proteínas, vitaminas y enzimas en una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados sometidos a una reacción de Fenton, en donde se probaron concentraciones fisiológicas de ácido ascórbico, α y γ -tocoferol, β -caroteno, albúmina, transferrina, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión y glutatión peroxidasa. Se cuantificó la cantidad de moléculas que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) producidas en cada reacción, la cual se comparó con una muestra control. Los tocoferoles α y γ se comportaron de forma similar, ambos

Laboratorio de Nutrición Molecular, Instituto de Ciencias de la Salud, Centro de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Actopan-Tilcuautla S/N, Ex Hacienda de la Concepción, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. C.P 42162.
Corresponding author: Tel +52 (771) 7172000 Ext 5116, Fax 5111, glopez@uaeh.edu.mx

redujeron las TBARS un $24.9 \pm 3.0\%$ y $23.0 \pm 2.2\%$ respectivamente, $p < 0.01$; la apo-transferrina fue la molécula con mayor CA ($-71.5 \pm 1.7\%$, $p < 0.01$) seguida de la albúmina ($-52.3 \pm 1.7\%$, $p < 0.01$), el efecto antioxidante observado en la albúmina comprometió su estructura, fragmentándola en péptidos de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos indican que al igual que los tocoferoles, la albúmina y transferrina son antioxidantes que previenen la oxidación *in vitro* de ácidos grasos poliinsaturados expuestos a una reacción de Fenton.

Palabras clave: ácidos grasos poliinsaturados, lipoperoxidación, capacidad antioxidante, TBARS.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo caracterizado por un desequilibrio oxidante/antioxidante de una célula intacta es una condición que se ha asociado con múltiples patologías en diferentes estados del desarrollo (Guggenheim & Wolinsky, 1981). Al respecto, los estudios se han centrado en aclarar cuál es el rol que el estrés oxidativo tiene en la etiología y progresión de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) (Blake *et al.*, 1989; Collins, Duthie, & Ross, 1994; Gey, 1986), estados de desnutrición (Golden & Ramdath, 1987; Manary, Leeuwenburgh, & Heinecke, 2000; Ohtsuka, Kojima, Ohtani, & Hayashi, 1998) así como en procesos tan inherentes al hombre como el envejecimiento (Cutler, 1991).

El estado antioxidante representa el equilibrio entre las defensas antioxidantes y los oxidantes en un organismo vivo (Lapenna, Ciofani, Pierdomenico, Giamberardino, & Cuccurullo, 2001), un desequilibrio en cualquiera de los dos componentes pueden causar estrés oxidativo. En humanos las moléculas a las cuales se les ha conferido una función antioxidante son múltiples, las de origen endógeno son principalmente enzimas, como la glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) así como proteínas de transporte como transferrina y albúmina; y algunas provenientes de la dieta como vitaminas y minerales, siendo el selenio, ácido ascór-

bico, β -caroteno y el α -tocoferol los más estudiados.

Debido a la importancia del estrés oxidativo en las ECNT en humanos y modelos animales se han utilizado diversos indicadores para evaluar la CA y el estado oxidativo, desde los no invasivos, como la cuantificación de hidrocarburos volátiles (Knutson, Handelman, & Viteri, 2000) y los ecosanodides en orina, (Lee, Shoeman, & Csallany, 1992; Nelson, Morris, Schmidt, & Levander, 1993) así como los invasivos como la medición en sangre de las TBARS (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979), oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) provenientes del suero (Esterbauer, Striegl, Puhl, & Rotheneder, 1989) y los niveles de nutrientes antioxidantes, quienes son los indicadores más utilizados para evaluar la CA. De todos los anteriores la cuantificación de TBARS en sangre es la medición más utilizada para evaluar estrés oxidativo a pesar de las controversias al respecto (Lapenna, *et al.*, 2001).

Para fines de evaluación clínica y/o poblacional se requiere utilizar métodos de bajo costo que reflejen adecuadamente un estado antioxidante, además, es necesario conocer cuales son las moléculas o nutrientes que tienen la mayor actividad antioxidante en los sistemas *in vitro* o en los métodos seleccionados para realizar la evaluación; para tal efecto en este estudio se determinó la CA *in vitro* de antioxidantes de distinta naturaleza en una mezcla de

ácidos grasos poliinsaturados sometidos a una reacción de Fenton (AGPFent). Se evaluaron de forma independiente algunos nutrientes o proteínas con función antioxidante descrita, se probaron concentraciones fijas de ácido ascórbico, α -tocoferol, γ -tocoferol, β -caroteno, albúmina, transferrina; así como de enzimas como CAT, SOD, glutatión reducido (GSH) y GPx.

Material y Métodos

Evaluación de la capacidad antioxidante

Para medir la CA se utilizó el principio de las TBARS, aplicando un método modificado de la técnica descrita por Hicks JJ y Medina-Navarro (Hicks & Medina-Navarro, 1995), denominado AGPFent. En un sistema de 2 mL, compuesto por un amortiguador trizma base 7.2 mM, pH 8.0, se colocó una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, linoléico (89.2 η moles) y linoleico (89.7 η moles), 1 μ mol de FeCl_2 y 2.5 μ moles de H_2O_2 (pH 5.1). La mezcla se incubó 15 minutos a 37°C, adicionando 1.0 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.375% (95°C durante 15 minutos), la reacción se detuvo con 500 μ L de HCl 2 N y se leyó absorbancia a una longitud de onda de 532 nm, a esta mezcla se le consideró como la oxidación máxima (control).

Capacidad antioxidante de los principales compuestos antioxidantes

Con el fin de establecer la función *in vitro* de algunos nutrientes, proteínas y enzimas con mayor evidencia científica contra la lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados, se evaluó la CA del ácido ascórbico (Levine, 1986), α -tocoferol (Burton & Traber, 1990), γ -tocoferol (Devaraj & Traber, 2003), β -caroteno (Burton & Ingold, 1984), albúmina (Bourdon & Blache, 2001), transferrina (Aruoma & Halliwell, 1987), CAT (Calabrese & Canada, 1989), SOD (Fridovich, 1986), GPx (Ursini & Bindoli, 1987) y GSH (Anderson, Underwood,

Bridges, & Meister, 1989), utilizando mezclas equivalentes a las concentraciones medias reportadas en rangos normales en plasma o suero de humanos. Los resultados del efecto antioxidante de cada uno de los compuestos se informan como porcentajes de reducción en relación con la oxidación máxima.

Las soluciones de moléculas y nutrientes antioxidantes se prepararon en el momento del análisis y se probaron de forma independiente en la mezcla de AGPFent, el volumen probado en cada reacción fue de 20 μ L. Se utilizó L (+) ácido ascórbico (Mca Riedel-de Haën) a una concentración de 0.95 mg/dL (Devasena, Lalitha, & Padma, 2001), de la cual se tomaron 9.5 μ g para adicionarlo a la mezcla de AGPFent. El (+)- α -acetato de tocoferol (SIGMA-Aldrich) se preparó a una concentración de 800 μ g/dL y fue diluido en dimetil sulfóxido (Sokol, Heubi, Iannaccone, Bove, & Balistreri, 1984), de la solución se tomaron 0.16 μ g. El γ -tocoferol utilizado fue (+)- γ -tocoferol (SIGMA-Aldrich) a una concentración de 4.18 μ M (diluido con dimetil sulfóxido) (Gross, Yu, Hannan, Prouty, & Jacobs, 2003), del cual se tomaron 9.5 μ g. El último antioxidante probado fue β -caroteno sintético (SIGMA-Aldrich) a una concentración de 0.32 μ M (diluido con dimetil sulfóxido), y se probaron 3.5 η g.

Se utilizó albúmina bovina (PM \cong 70,000) a una concentración de 4.5 g/dL (SIGMA-Aldrich) de esta mezcla se probaron 0.9 mg en el sistema AGPFent para evaluar su efecto antioxidante independiente. La transferrina (PM \cong 79,500) que se utilizó fue apo-transferrina humana (SIGMA-Aldrich) a una concentración de 250 mg/dL, de la cual se probaron 50 μ g.

Se preparó CAT bovina (SIGMA-Aldrich) a una concentración de 34.5 U/g de hemoglobina (Hb) (Castenmiller et al., 1999), de la mezcla se probaron 20 μ L (0.083 U). De la SOD bovina (SIGMA-Aldrich) se preparó una solución de 3 U/mg (Squali Houssaini, Arnaud, Richard, Renversez, & Favier,

1997) y se probaron en el sistema AGPFent 20 U. La GPx bovina (SIGMA-Aldrich) se preparó a una concentración de 68.85 U/g Hb, (Castenmiller, *et al.*, 1999), de esta mezcla se probaron 0.16 U. La concentración de GSH elegida fue de 2.42 μ moles/g Hb (Fechner *et al.*, 2001), para tomar 1.8 μ g. Todas las proteínas de transporte y enzimas se diluyeron en una solución de buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.0.

Electroforesis de proteínas

Una vez que se evaluó la CA de la albúmina y la transferrina en el sistema de AGPFent, se extrajo la proteína del medio con 100 μ l de ácido perclórico 2 M, y se precipitaron centrifugando la mezcla a 14,000 rpm, 10 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante y el paquete proteico se reconstituyó con buffer de fosfatos 100 mM. Para separar las proteínas se usó un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS), el gel separador fue preparado con buffer tris 3M pH 8.8, acrilamida al 30%, con una relación bis acrilamida/acrilamida de 1:37, TEMED al 0.06%, SDS al 10% y persulfato de amonio al 10%. EL gel concentrador se preparó con buffer tris 0.5 M, pH 6.8, TEMED al 0.06%, acrilamida al 30%, SDS al 10% y persulfato de amonio al 10%.

Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron en el software SPSS (SPSS versión 10, Chicago, IL). Los datos se presentan como el promedio de cada grupo experimental \pm la desviación estándar. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía con una post prueba de Turkey para comparar las diferencias entre los grupos. Las diferencias entre dos grupos se establecieron con la prueba t-Student. Se consideró un nivel de significancia con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó *in vitro* la capacidad antioxidante

de cada uno de los nutrientes, proteínas y enzimas antioxidantes con mayor evidencia científica en los procesos de peroxidación de lípidos. La oxidación máxima (control) sin antioxidantes produjo en promedio 10.2 ± 0.5 η moles de TBARS, lo que representó el 100% de oxidación. Con el ácido ascórbico se cuantificó un aumento del 10% en la cantidad de TBARS al compararse con el control, esto está relacionado con su función prooxidante debido a que el ácido ascórbico reduce el Fe^{3+} en Fe^{2+} y de esta manera mantiene el sustrato para continuar con la reacción de Fenton, esta evidencia es bien conocida y se da principalmente en estados de sobredosis de hierro (Chen *et al.*, 2000; Dasgupta & Zdunek, 1992; Miller & Aust, 1989).

El α -tocoferol es referida como la molécula con una mayor CA en soluciones de lípidos (Liebler, 1998; Skinner & Parkhurst, 1970), sin embargo, en este experimento el efecto antioxidante del α -tocoferol y el γ -tocoferol fue semejante en la mezcla de AGPFent, estas moléculas redujeron la cuantificación de TBARS un $24.9 \pm 3.0\%$ vs $23.0 \pm 2.2\%$ respectivamente. La capacidad antioxidante de los tocoferoles está relacionada con la inactivación en este medio del radical hidróxilo y peróxido, además se ha descrito que entre la forma α y γ existe una similitud en su actividad como atrapadores para el singulete de oxígeno (100/100) (Kaiser, Di Mascio, Murphy, & Sies, 1990).

Existe evidencia que indica que el β -caroteno reacciona con el radical lipídico formando un radical intermediario que en el momento de reaccionar con otro radical lipídico forma un producto estable (Burton, 1989) y así se rompe la reacción en cadena de la lipoperoxidación, la CA del β -caroteno en la mezcla AGPFent fue del $16.8 \pm 1.7\%$ menor al control, proporción que es mas baja a la CA observada en los tocoferoles α y γ . (Tabla 1).

Los resultados obtenidos con la albúmina bovina permiten proponerla como

Tabla 1. Capacidad antioxidante de vitaminas, enzimas y proteínas de transporte en el sistema de AGPFent

Vitaminas	Porcentaje de cambio
Acido ascórbico	9.3 ± 0.9+
α-Tocoferol	- 24.9 ± 3.0
γ-Tocoferol	- 22.1 ± 2.5
β-Caroteno	- 16.8 ± 1.7
Enzimas	
SOD	- 49.3 ± 1.0*
CAT	- 49.9 ± 1.8*
GPx	- 39.2 ± 2.1+
Proteínas/péptidos	
Albumina	- 52.3 ± 1.7*
Transferrina	- 71.6 ± 2.7+
GSH	- 47.3 ± 8.8*

Los datos representan la reducción en la oxidación de lípidos (TBARS) al compararse con una muestra control. Se reportan los promedios de 3 mediciones independientes ± DE. El símbolo + indica diferencias con los otros grupos, $p < 0.05$ para la prueba ANOVA con un test de Turkey, el símbolo * indica diferencias en relación al grupo control para la prueba t-Student, pero sin diferencias entre el grupo para la prueba de ANOVA.

un efectivo antioxidante durante la liperoxidación, ésta fue capaz de evitar en más del 50% el daño producido por el radical hidroxilo, producto de la reacción del H_2O_2 y el hierro; la albúmina redujo en promedio la cuantificación de TBARS en la mezcla AGPFent un $52.3 \pm 1.7\%$; esta proteína se fragmentó durante su actividad antioxidante, el gel de poliacrilamida/SDS reveló bandas de aproximadamente 10, 15, 40 y 70 kDa (Figura 1), estas bandas presentan un peso similar a las observadas en albúmina expuesta a Cu y ascorbato (Marx & Chevion, 1986). La fragmentación de las proteínas es ocasionada por los radicales hidroxilo así como los iones peróxido (Davies, Lin, & Pacifici, 1987; Dubinina *et al.*, 2002); esto se aplica también para la albúmina, la cual puede prevenir la peroxidación quelando hierro y atrapando radicales li-

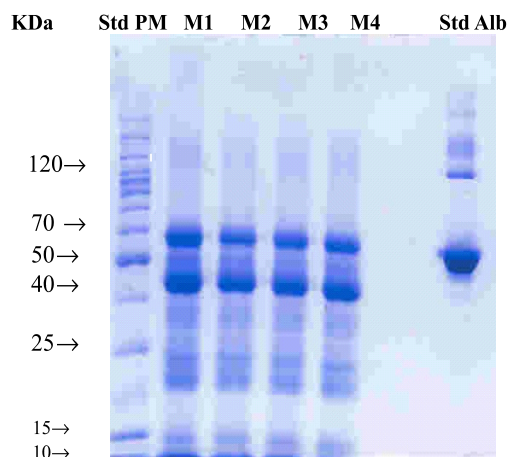


Figura 1. SDS-PAGE de cuatro muestras independientes de albúmina bovina (M1= muestra 1, M2= muestra 2, M3= Muestra 3 y M4= muestra 4) aisladas del sistema de micelas con Fenton una vez que se realizó la reacción. En cada pozo se adicionaron 20 µg de la proteína. Std Alb (estándar de albúmina sin someterse a la reacción AGPFent).

bres de oxígeno (Fukuzawa, *et al.*, 2005). La fragmentación de la albúmina durante estados de estrés mediados por hierro podría tener implicaciones muy importantes en la nutrición humana, principalmente en la fisiopatología del kwashiorkor; es posible que en estados graves de desnutrición la albúmina pierda su conformación estructural y de esta manera su función antioxidante así como su capacidad oncótica en el plasma y como consecuencia se presente el edema característico en el Kwashiorkor.

En la apo-transferrina se observó el mayor efecto antioxidante en relación a todas las antioxidantes probados, se cuantificó un $71.5 \pm 1.7\%$ menor cantidad de TBARS cuando a la mezcla de AGPFent se le adicionó apo-transferrina, este resultado es concordante con la función de la proteína, la cual transporta hierro y la reacción de Fenton se evita sin la disponibilidad de hierro libre (Cairo, Recalcati, Pietrangelo, & Minotti, 2002). A diferencia de la albúmina, la transferrina no mostró alteraciones en su estructura (Figura 2), por lo que se supone que solo se saturó de hierro. Las

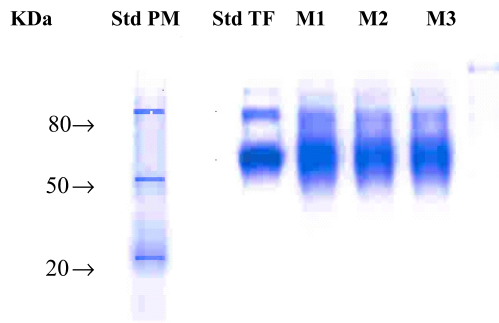


Figura 2. SDS-PAGE de tres muestras independientes de transferrina (M1= muestra 1, M2= muestra 2 y M3= Muestra 3) aisladas del sistema de micelas con Fenton una vez que se realizó la reacción. En cada pozo se adicionaron 20 μ g de la proteína. Std TF (Estándar de transferrina sin someterse a la reacción AGPFent).

enzimas CAT, SOD, GPx y el GSH tuvieron comportamientos similares en su CA, en estas proteínas se cuantificó en promedio de 40-50% menos TBARS en relación con la muestra control (Tabla 1). En estas condiciones de reacción es posible que la CAT convirtiera al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Eremin & Metelitsa, 1996), de tal forma que se evitó que reaccionara con el hierro, la GPx catalizó la reducción de óxidos a alcoholes y el GSH redujo los hidroperóxidos lipídicos y/o neutralizó radicales hidroxilo. Debido a que la principal función de la SOD es la dismutación del anión superóxido, el cual se forma durante la descomposición del ácido linoleico inducido por el ion ferroso (Kambayashi *et al.*, 2003), la SOD pudo evitar la disponibi-

lidad del anión superóxido y la formación de su forma protonada y de esta forma la peroxidación (De Grey, 2002; Roginsky & Barsukova, 2001). La función de las enzimas antioxidantes puede estar relacionada también con la capacidad antioxidante de aminoácidos como el triptófano, la cisteína, tirosina, fenilalanina e histidina, por lo que la reducción del daño oxidativo observado en la emulsión de ácidos grasos podría ocasionar una modificación oxidativa de la estructura de cualquier proteína independientemente de su función (Dubinina, *et al.*, 2002). Es necesario aclarar que en este trabajo de investigación se reporta la CA independiente de algunos antioxidantes, por lo que se realizó una mezcla de todas las moléculas probadas a la misma concentración, se observó que esta mezcla reduce en un 64.5 ± 4.1 % la cantidad de TBARS en relación al control; sin embargo, no se determinó que molécula pudo tener una mayor CA, ni se establecieron interacciones entre antioxidantes como potencializadores de reacciones, condiciones que *in vivo* son comunes.

CONCLUSIONES

Los resultados permiten proponer que las proteínas albúmina y transferrina tienen una potente actividad antioxidante en los sistemas que producen lipoperóxidos a través de una reacción de Fenton, esto fue observado también en proteínas con actividad enzimática como la CAT y SOD, quienes presentaron un efecto antioxidante mayor al registrado para los tocoferoles, los cuales son reconocidos como los mejores antioxidantes contra la lipoperoxidación.

REFERENCIAS

- Anderson, M. E., Underwood, M., Bridges, R. J., Meister, A. (1989). Glutathione metabolism at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *FASEB Journal* **3**: 2527-2531.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B. (1987). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochemical Journal* **241**: 273-278.
- Blake, D. R., Merry, P., Unsworth, J., Kidd, B. L., Outhwaite, J. M., Ballard, R., et al. (1989). Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet* **1**: 289-293.
- Bourdon, E., Blache, D. (2001). The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxidants & Redox Signaling* **3**: 293-311.
- Burton, G. W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *Journal of Nutrition* **119**: 109-111.
- Burton, G. W., Ingold, K. U. (1984). beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**: 569-573.
- Burton, G. W., Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* **10**: 357-382.
- Cairo, G., Recalcati, S., Pietrangelo, A., Minotti, G. (2002). The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine* **32**: 1237-1243.
- Calabrese, E. J., Canada, A. T. (1989). Catalase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacology & Therapeutics*, **44**: 297-307.
- Castenmiller, J. J., Lauridsen, S. T., Dragsted, L. O., van het Hof, K. H., Linssen, J. P., West, C. E. (1999). beta-carotene does not change markers of enzymatic and nonenzymatic antioxidant activity in human blood. *Journal of Nutrition* **129**: 2162-2169.
- Collins, A., Duthie, S., Ross, M. (1994). Micronutrients and oxidative stress in the aetiology of cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* **53**: 67-75.
- Cutler, R. G. (1991). Antioxidants and aging. *American Journal of Clinical Nutrition* **53**(1 Suppl): 373S-379S.
- Chen, K., Suh, J., Carr, A. C., Morrow, J. D., Zeind, J., Frei, B. (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **279**: E1406-1412.
- Dasgupta, A., Zdunek, T. (1992). In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate. *Life Sciences*, **50**: 875-882.
- Davies, K. J., Lin, S. W., Pacifici, R. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 9914-9920.
- De Grey, A. D. (2002). HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol*, **21**(4), 251-257.
- Devaraj, S., Traber, M. G. (2003). Gamma-tocopherol, the new vitamin E? *American Journal of Clinical Nutrition* **77**: 530-531.
- Devasena, T., Lalitha, S., Padma, K. (2001). Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clinica Chimica Acta* **308**: 155-161.
- Dubinina, E. E., Gavrovskaya, S. V., Kuzmich, E. V., Leonova, N. V., Morozova, M. G., Kovrugina, S. V., et al. (2002). Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system. *Biochemistry (Mosc)* **67**: 343-350.

- Eremin, A. N., Metelitsa, D. I. (1996). [Catalytic properties of catalase in microemulsions of surface-active agents in octane]. *Biokhimiia* **61**: 1672-1686.
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M. (1989). Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications* **6**: 67-75.
- Fechner, A., Bohme, C., Gromer, S., Funk, M., Schirmer, R., Becker, K. (2001). Antioxidant status and nitric oxide in the malnutrition syndrome kwashiorkor. *Pediatric Research* **49**: 237-243.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* **58**: 61-97.
- Fukuzawa, K., Saitoh, Y., Akai, K., Kogure, K., Ueno, S., Tokumura, A., *et al.* (2005). Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica et Biophysica Acta* **1668**: 145-155.
- Gey, K. F. (1986). On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. *Bibliotheca nutritio et dieta* **37**: 53-91.
- Golden, M. H., Ramdath, D. (1987). Free radicals in the pathogenesis of kwashiorkor. *Proceedings of the Nutrition Society* **46**: 53-68.
- Gross, M., Yu, X., Hannan, P., Prouty, C., Jacobs, D. R., Jr. (2003). Lipid standardization of serum fat-soluble antioxidant concentrations: the YALTA study. *American Journal of Clinical Nutrition* **77**: 458-466.
- Guggenheim, Y. K., Wolinsky, I. (1981). *Nutrition and nutritional diseases : the evolution of concepts*. Lexington, Mass.: Collamore Press.
- Hicks, J. J., Medina-Navarro, R. (1995). Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. *Archives of Medical Research*, **26**: 169-172.
- Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1990). Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **277**: 101-108.
- Kambayashi, Y., Tero-Kubota, S., Yamamoto, Y., Kato, M., Nakano, M., Yagi, K., *et al.* (2003). Formation of superoxide anion during ferrous ion-induced decomposition of linoleic acid hydroperoxide under aerobic conditions. *The Journal of Biochemistry* **134**: 903-909.
- Knutson, M. D., Handelman, G. J., Viteri, F. E. (2000). Methods for measuring ethane and pentane in expired air from rats and humans. *Free Radical Biology & Medicine* **28**: 514-519.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S. D., Giamberardino, M. A., Cuccurullo, F. (2001). Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine* **31**: 331-335.
- Lee, H. S., Shoeman, D. W., Csallany, A. S. (1992). Urinary response to *in vivo* lipid peroxidation induced by vitamin E deficiency. *Lipids* **27**: 124-128.
- Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *The New England Journal of Medicine* **314**: 892-902.
- Liebler, D. C. (1998). Antioxidant chemistry of alpha-tocopherol in biological systems. Roles of redox cycles and metabolism. *Subcellular Biochemistry* **30**: 301-317.
- Manary, M. J., Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W. (2000). Increased oxidative stress in kwashiorkor. *Journal of Pediatrics* **137**: 421-424.
- Marx, G., Chevion, M. (1986). Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochemical Journal* **236**: 397-400.
- Miller, D. M., Aust, S. D. (1989). Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **271**: 113-119.

- Nelson, G. J., Morris, V. C., Schmidt, P. C., Levander, O. (1993). The urinary excretion of thiobarbituric acid reactive substances and malondialdehyde by normal adult males after consuming a diet containing salmon. *Lipids* **28**: 757-761.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351-358.
- Ohtsuka, A., Kojima, H., Ohtani, T., Hayashi, K. (1998). Vitamin E reduces glucocorticoid-induced oxidative stress in rat skeletal muscle. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)* **44**: 779-786.
- Roginsky, V., Barsukova, T. (2001). Superoxide dismutase inhibits lipid peroxidation in micelles. *Chemistry and Physics of Lipids* **111**: 87-91.
- Skinner, W. A., Parkhurst, R. M. (1970). Antioxidant properties of alpha-tocopherol derivatives and relationship of antioxidant activity to biological activity. *Lipids* **5**: 184-186.
- Sokol, R. J., Heubi, J. E., Iannaccone, S. T., Bove, K. E., Balistreri, W. F. (1984). Vitamin E deficiency with normal serum vitamin E concentrations in children with chronic cholestasis. *New England Journal of Medicine*, **310**: 1209-1212.
- Squali Houssaini, F. Z., Arnaud, J., Richard, M. J., Renversez, J. C., Favier, A. (1997). [Evaluation of oxidative stress and antioxidant defences in malnourished Moroccan children]. *Annals of Nutrition and Metabolism* **41**: 149-159.
- Ursini, F., Bindoli, A. (1987). The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **44**: 255-276.