



CARDIOLOGÍA DEL ADULTO - TRABAJOS LIBRES

Micro-organismos efectivos (EM-X): acción *in-vivo* sobre aorta de conejos hipercolesterolémicos

Effective microorganisms (EM-X): in-vitro action on aorta of hypercholesterolemic rabbits

Darío Echeverri, MD.⁽¹⁾; Félix Montes, MD.⁽¹⁾; Lorena Buitrago, MSc.⁽¹⁾; Alexandra Delgadillo, MSc.⁽¹⁾; Marcela Beltrán, MSc.⁽¹⁾; Amílcar Salgado⁽²⁾

Bogotá, D.C., Colombia

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS: EM-X es una bebida antioxidante derivada del salvado de arroz y extractos de algas marinas fermentadas con micro-organismos efectivos. El objetivo de este estudio fue determinar si el EM-X previene la formación de placa aterosclerótica y favorece la relajación vascular *in-vitro* en un modelo de aterosclerosis temprana en conejos hipercolesterolémicos.

MÉTODOS: la población se dividió en cuatro grupos: 1: conejos ateroscleróticos con administración de EM-X; 2: conejos ateroscleróticos sin administración de EM-X; 3: conejos sanos sin administración de EM-X; y 4: conejos sanos con administración de EM-X. A cada conejo se le midió el colesterol sérico y se le extrajeron anillos aórticos para análisis *in-vitro* de la relajación vascular dependiente e independiente de endotelio. Se realizaron análisis histomorfométricos y cuantificación de la endotelización arterial.

RESULTADOS: la cifra de colesterol total fue mayor en los grupos 1 vs. 2 y 3 vs. 4 ($p > 0,05$). La RDE inducida por acetilcolina, mostró disfunción en los grupos con hipercolesterolemia y aterosclerosis. No se observaron diferencias entre los grupos 1 y 2 ($p = 0,181$), ni entre los grupos 3 y 4 ($p = 0,349$). Las características histomorfométricas no presentaron diferencias entre los grupos 1 y 2 ($p = 0,85$) ni entre los grupos 3 y 4 ($p = 0,95$). El análisis de inmunohistoquímica no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p = 0,85$).

CONCLUSIÓN: los resultados encontrados no demuestran beneficio del EM-X como terapia antioxidante en la prevención de placa aterosclerótica y en la relajación vascular dependiente de endotelio *in-vitro* en animales sanos o enfermos con disfunción endotelial y aterosclerosis.

PALABRAS CLAVE: antioxidantes, endotelio, vasodilatación, micro-organismos.

BACKGROUND: EM-X is an antioxidant beverage obtained from rice bran and seaweed extracts fermented with Effective Microorganisms. The purpose of this study was to determine if EM-X prevents atherosclerotic plaque formation and favours *in vitro* vascular relaxation in a model of early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.

(1) Laboratorio de Investigación en Función Vascular, Fundación Cardio Infantil-Instituto de Cardiología, Bogotá, DC., Colombia.

(2) Fundación de Asesorías para el Sector Salud. FUNDASES. Universidad Minuto de Dios, Bogotá, DC., Colombia.

Correspondencia: Dr. Darío Echeverri, Calle 163 A No. 13-60. Primer piso. Servicio de Hemodinamia - Laboratorio de Investigación en Función Vascular. Teléfonos: (57-1-) 6791192 - 6672727 Ext.: 1114, 4322, Fax: (57-1) 6690382. Bogotá, DC., Colombia. Correo electrónico: decheverri@cardioinfantil.org, funcionvascular@cardioinfantil.org.

Recibido: 9/10/06. Aceptado: 30/04/07.

METHODS: The study population was divided in four groups: 1. atherosclerotic rabbits administered with EM-X; 2. atherosclerotic rabbits not administered with EM-X; 3. healthy rabbits not administered with EM-X; and 4. healthy rabbits administered with EM-X. Serum cholesterol was measured in each rabbit and vascular rings were obtained for conducting the endothelium dependent relaxation (EDR) *in vitro* analysis. Additionally, hystomorphometrical analysis and endothelial cell quantification were performed.

RESULTS: Whole cholesterol measurements differed significantly in groups 1 vs. 2 and 3 vs. 4 ($p < 0.05$). EDR did not differ significantly between groups 1 and 2 ($p = 0.181$), or between groups 3 and 4 ($p = 0.349$). Hystomorphometrical characteristics did not show significant differences neither in groups 1 and 2 ($p = 0.85$) nor in groups 3 and 4 ($p = 0.95$). The immunohistochemical analysis did not show significant differences between any groups ($p = 0.85$).

CONCLUSION: The results found do not demonstrate the benefits of EM-X as antioxidant therapy in the prevention of atherosclerotic plaque formation and *in vitro* endothelium dependent vascular relaxation in healthy animals or with endothelial dysfunction and atherosclerosis.

KEY WORDS: antioxidants, endothelium, vasodilation, microorganisms.

(Rev Colomb Cardiol 2007; 14: 123-132)

Introducción

La aterosclerosis aún es la principal causa de muerte en países desarrollados con características de comportamiento endémicas (1). Cerca de 62 millones de pacientes norteamericanos tienen uno o más tipos de enfermedad cardiovascular, de los cuales más de un millón tienen eventos cardíacos súbitos cada año. El 50% de los pacientes con síndromes coronarios agudos no tiene síntomas previos (2, 3).

En los pasados 15 años, estudios epidemiológicos (4, 5), biológicos y moleculares (6-8) y en aterosclerosis experimental (9-11) dieron soporte a la teoría que los antioxidantes pueden proteger contra la aterosclerosis, ya que limitan la oxidación del c-LDL y de esta manera reducen la acumulación de macrófagos que median la acumulación de ésteres de colesterol en el núcleo lipídico de la placa aterosclerótica. El incremento en el número de células espumosas (12), en la actividad inflamatoria local (13, 14) y en el tamaño del núcleo lipídico (15, 16) se identificó como característica de alto riesgo de ruptura (placa vulnerable). Aunque se han propuesto otros mecanismos de acumulación de lípidos en la placa (17), la oxidación del c-LDL tiene un gran atractivo terapéutico (18). En el mismo periodo de tiempo, estudios clínicos encontraron reducción del riesgo de eventos cardiovasculares con la disminución farmacológica del c-LDL (19, 20). Las hipótesis de las terapias antioxidantes se basaron en un gran número de informes científicos realizados entre 1994 y 2000 (21-25). Las conclusiones de estos estudios se resumen brevemente así:

1. Existe poco o ningún beneficio de la vitamina E con las dosis empleadas.
2. No hay beneficio cardiovascular con los β -carotenos.
3. No hay evidencia de beneficio contra el cáncer usando vitamina E en fumadores en corto plazo.

La totalidad de la evidencia en estudios recientes de terapia con vitaminas antioxidantes, demuestra que ellas no tienen ningún beneficio sobre la población general. Muchos estudios epidemiológicos y experimentales implican los factores dietéticos en la causa y prevención de importantes enfermedades crónicas tales como la aterosclerosis. EM-X (Figura 1) es una bebida antioxidante novedosa derivada del salvado de arroz y de extractos de algas marinas fermentados con microorganismos efectivos (EM). EM-X contiene más de 35 minerales, α -tocoferoles, lycopene, ubiquinona, saponina y flavonoides. Aunque se desconoce cual es el efecto de EM-X a nivel de prevención de placa aterosclerótica temprana, estudios recientes han demostrado que en células epiteliales alveolares EM-X inhibe, a nivel transcripcional, la expresión de IL-8, reduciendo el TNF α , y la liberación de radicales libres; además, inhibe el ácido ascórbico y el cloruro férrico inducido por la



Figura 1. Presentación comercial de microorganismos efectivos (EM-X).

peroxidación no-enzimática en células cerebrales (26). En ratas, EM-X ha demostrado proteger las neuronas de la retina contra el efecto de N-metil D-aspartame, un agonista del glutamato (27), y tener una actividad antioxidante potente la cual ha resultado en un retardo del envejecimiento celular, y en una modulación del funcionamiento inmune (28). Se cree que todos estos resultados se asocian con los flavonoides, las sapolinas y la vitamina E que se encuentran en EM-X y que pueden eliminar directamente radicales libres o incrementar la actividad de la dismutasa súper óxido por transferencia de electrones (29).

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antioxidante *in-vivo* de la ingestión de EM-X en la formación de placa aterosclerótica y la relajación vascular *in-vitro* de anillos de aorta procedentes de conejos sanos y con aterosclerosis temprana.

Métodos

Se realizó un estudio experimental *in-vivo* para evaluar el efecto de la ingestión de EM-X sobre la formación de placa aterosclerótica temprana y la relajación vascular *in-vitro* en conejos sanos e hipercolesterolémicos. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal (CEIA) de la Institución y se siguieron las pautas del Ministerio de Salud de la República de Colombia para la Investigación Biomédica con animales, resolución No. 008430 de octubre de 1993 (30).

Modelo experimental

Se alimentaron treinta conejos blancos de raza Nueva Zelanda y de 3 kg de peso, con una dieta con suplemento de colesterol al 1% por periodos de cuatro semanas, alternando con dieta normal para un total de 16 semanas. En observaciones previas realizadas por los autores (31-33), este modelo experimental ha mostrado la producción de lesiones ateroscleróticas con abundante depósito de colesterol, macrófagos, células espumosas y disfunción endotelial.

Criterios de inclusión

Fueron elegibles para ingresar los conejos que cumplieron 16 semanas de dieta hipercolesterolémica.

Criterios de exclusión

Se excluyeron del estudio los conejos con infección sistémica severa o muerte temprana.

Diseño del estudio

Se diseñó un estudio experimental en conejos hipercolesterolémicos con enfermedad aterosclerótica (n= 20), teniendo como control conejos sanos de la misma edad (7 meses) (n=10). A los animales se les suministraron ciclos de luz y oscuridad naturales de 12 horas (aproximadamente de 6 a.m. a 6 p.m. y de 6 p.m. a 6 a.m.). Se mantuvieron en un rango de temperatura entre 2 y 18°C. Las condiciones de las jaulas mantuvieron un rango aproximado promedio de humedad de 80%. Las observaciones sobre la apariencia general de los animales y los signos de enfermedad, se registraron una vez al día en cada conejo hasta la fecha final del estudio. Se vigiló la aparición de vómito, heces anormales, diarrea, inhabilidad para caminar normalmente o de cualquier otro signo de enfermedad en las condiciones generales anormales, apariencia del animal, actividad, conducta, respiración, etc. En la semana 16 fueron sacrificados, previa obtención de colesterol sérico, y se extrajo cuidadosamente la aorta torácica para estudio de función vascular *in-vitro* y análisis histomorfométricos de la lesión aterosclerótica. A continuación se describen los grupos de estudio:

1. Grupo de aterosclerosis EM-X (n=10): animales alimentados con dieta normal con fórmula comercial con suplemento de colesterol al 1% e ingestión de agua a libre demanda y EM-X a dosis de 2 mL/día durante 16 semanas.

2. Grupo de aterosclerosis (n=10): animales alimentados con dieta normal con fórmula comercial y suplemento de colesterol al 1% e ingestión de agua a libre demanda sin EM-X durante 16 semanas.

3. Grupo control (n=5): animales alimentados con dieta normal con fórmula comercial Purina SA. (grasa total 4%, proteínas hasta 18%, fibra hasta 14% y ceniza hasta 10%), e ingestión de agua a libre demanda sin EM-X durante 16 semanas.

4. Grupo control EM-X (n=5): animales alimentados con dieta normal con fórmula comercial Purina SA. (grasa total 4%, proteínas hasta 18%, fibra hasta 14% y ceniza hasta 10%), e ingestión de agua a libre demanda con EM-X 2 mL/día durante 16 semanas.

Medición del colesterol sérico

Previo al sacrificio, en estado de ayuno y bajo efectos de sedación, se extrajeron 5 mL de sangre de una vena marginal de la oreja. Se utilizaron tubos sin anticoagu-

lante, los cuales fueron centrifugados durante 10 minutos a 3.000 rpm. El suero extraído fue sometido a técnica de química seca utilizando un equipo Vitros 250 (Johnson&Johnson).

Sacrificio de los animales

El sacrificio selectivo se desarrolló después de las 16 semanas de dieta, usando sedación con ketamina intramuscular e inyección letal de pentobarbital 150 mg/kg por vía intravenosa. Inmediatamente después, se removió la aorta. El segmento proximal (3 cm) de la aorta torácica fue aislado para el estudio de relajación vascular *in-vitro*.

Aspectos éticos

Todos los procedimientos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación animal de la Institución, y son acordes con los protocolos de manejo de animales de experimentación y diseñados para evitar incomodidades, sufrimiento y dolor a los animales. Se efectuaron bajo los efectos de sedantes, analgésicos o anestésicos adecuados. Todos los procedimientos se realizaron en un tiempo mínimo necesario.

Relajación vascular in-vitro

La preparación del segmento arterial para estudio de relajación vascular *in-vitro*, se realizó como se describió previamente (34). De cada vaso se obtuvieron de nueve a diez anillos. Los segmentos fueron cuidadosamente colocados en recipientes con solución de Krebs modificada con la siguiente composición (en mmol/L): NaCl 118, KCl 4,69, CaCl₂ 3,35, MgSO₄ 1,04, NaHCO₃ 25, D-glucosa 11,1 y pH 7,40 +/- 0,05. Los segmentos de aorta fueron transportados al Laboratorio de Investigación en Función Vasculares para ser preparados, lavados y sometidos a disección y limpieza del tejido conectivo exuberante. El tiempo que se utilizó entre la obtención del tejido y su preparación fue menor a 30 minutos. Los anillos fueron suspendidos entre dos asas de alambre en una cámara de vidrio en el equipo de baño de órganos, con 25 mL de solución de Krebs-Henseleit a 37°C y pH 7,40, aireada con O₂ 95% y CO₂ 5%. Uno de los alambres tensores estaba conectado al transductor de fuerza (Kent-Scientific Corporation, Litchfield, CT), y los cambios en fuerza isométrica fueron recolectados en un sistema computarizado de registro (Power Lab / 4Sp) y en un ambiente de Windows 2000. Cada anillo vascular permaneció suspendido en dicho sistema durante aproxi-

madamente 45 a 60 minutos, y luego se aplicó una tensión progresiva en reposo de 2 g, la cual fue definida en estudios preliminares. Para los experimentos, los anillos de aorta fueron precontraídos con norepinefrina (NE) (5,5 Log M) agregada al baño de órganos obteniendo curvas dosis-respuesta.

La relajación independiente de endotelio (RIE) fue evaluada en anillos pre-contraídos con NE, usando nitroglicerina (NTG) (8 a 4 Log M) con incremento de concentraciones (en pasos de 0,5 unidades log) cada 15 minutos. La relajación dependiente de endotelio (RDE) fue evaluada en anillos pre-contraídos con NE (curvas respuesta de contracción acumulada de 50% a 80% de la contracción máxima) con el uso de acetilcolina (Ach) (6 Log M). Solamente se administró un tratamiento (Ach o NTG) en cada anillo de aorta. Ambos efectos máximos de relajación fueron registrados usando curvas continuas de relajación e informadas en porcentajes de respuesta en relación con el reposo y en curvas con pre-contracción.

Evaluación histomorfométrica

Inmediatamente después de obtener la aorta para evaluación de la función vascular, ésta fue cuidadosamente removida. El segmento distal de aorta torácica y por encima de la arteria renal, se mantuvo y se perfundió de forma manual con paraformaldehído en solución fosfato al 10% a 100 mm Hg durante 30 minutos. Se cortó en un segmento de 4 mm para análisis histomorfométricos.

Procesamiento del tejido

Después de la fijación tisular en formalina, los segmentos se embebieron en parafina a 56-58°C. Las secciones se realizaron a 4-µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina y por el método de tricrómico elástica. Se hizo un análisis individual de los segmentos por medio de un microscopio de luz (Olympus BX50). Los segmentos se midieron con morfometría digital y planimetría computarizada (Media Cybernetics® Image-Pro Plus™). Además, los segmentos fueron sometidos a técnicas de inmunohistoquímica para tinción de células endoteliales con anticuerpos CD31 (Dako Corporation).

Morfometría

El centro de cada segmento de aorta examinado fue localizado sistemáticamente en el centro del campo del objetivo, usando magnificación 2X.

El área del vaso corresponde al área comprendida dentro de la lámina elástica externa (mm^2); el área del lumen corresponde al área dentro de la superficie endotelial (mm^2) y el área de la placa aterosclerótica corresponde al área comprendida entre la lámina elástica interna y el lumen arterial cuantificada en mm^2 .

Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar. El valor de significancia se estableció con un valor $p \leq 0,05$. Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el *software statistical package for the social science* (SPSS) 11,5.

Para determinar si el porcentaje máximo de RDE se relaciona con el nivel de colesterol sérico, se realizó una regresión lineal. A partir de los resultados de esta regresión se calcularon los residuos no estandarizados que corresponden a la varianza en el porcentaje de RDE que no es explicada por el colesterol sérico. Estos residuos no estandarizados permitieron determinar el efecto del EM-X una vez la influencia del colesterol sérico sobre la RDE ha sido controlada. Para esto se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Con el fin de determinar si el EM-X tenía un efecto sobre la función vascular, se calculó el EC-50 para cada conejo. EC-50 se define como la concentración del agente vasodilatador que causa un 50% de relajación. A partir de los valores de EC-50 obtenidos, se realizó un análisis de co-varianza (ANCOVA) en donde se evaluó el efecto del EMX y paralelamente el posible efecto del colesterol sobre el EC-50. Además, se realizó una prueba de Tukey para evaluar diferencias entre tratamientos en los valores obtenidos de EC-50.

Resultados

De un total de 30 animales, 29 terminaron satisfactoriamente la observación durante las 16 semanas. Un animal perteneciente al grupo 1, falleció debido a una infección respiratoria severa durante la fase de observación. El peso al final de la observación fue de $4,8 \pm 0,2$ kg en los grupos 1 y 2, los cuales recibieron dieta rica en colesterol, y $4,1 \pm 0,3$ kg en los grupos 3 y 4 que recibieron dieta comercial normal, con una diferencia significativamente estadística ($p=0,01$).

No se presentaron eventos como vómito, heces anormales, diarrea, o inhabilidad motora. La apariencia de los animales, la actividad, la conducta y la respiración fueron normales en todos los grupos examinados.

Luego del sacrificio, para análisis de función vascular *in-vitro* se obtuvieron 36 segmentos en el grupo 1, 40 segmentos en el grupo 2, 20 segmentos en el grupo 3 y 20 segmentos en el grupo 4. Además, para análisis histomorfométricos se obtuvieron 9 segmentos en el grupo 1, 10 segmentos en el grupo 2, 6 segmentos en el grupo 3 y 5 segmentos en el grupo 4.

Niveles de colesterol sérico

La cifra de colesterol total basal al ingreso del estudio fue de $53,1 \pm 5,3$ mg/dL para el total de los animales. Luego del seguimiento clínico, la cifra de colesterol total fue de $1.614,1 \pm 855,5$ en el grupo 1; $946,8 \pm 417,3$ en el grupo 2; $51,2 \pm 15,1$ en el grupo 3 y $101,0 \pm 22,5$ en el grupo 4. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 vs. 3 y 4 ($p < 0,001$) y ninguna diferencia entre los grupos 1 vs. 2 y 3 vs. 4 ($p > 0,05$).

Relajación vascular independiente de endotelio

La NTG indujo una relajación vascular máxima en el grupo 1 del $52,4 \pm 15,6\%$ y un EC-50 $1,4 \times 10^{-6}$ M y en el grupo 2 del $43,2 \pm 16,8\%$ y un EC-50 $1,7 \times 10^{-6}$ M. En el grupo 3 del $67,4 \pm 22,0\%$ y un EC-50 $2,0 \times 10^{-7}$ M y en el grupo 4 del $35,0 \pm 20,4\%$ y un EC-50 $3,5 \times 10^{-6}$ M.

Relajación vascular dependiente de endotelio

La Ach indujo una relajación vascular máxima en el grupo 1 del $21,8 \pm 8,2\%$, en el grupo 2 del $17,6 \pm 8,0\%$. En el grupo 3 del $62,8 \pm 40,8\%$ y en el grupo 4 del $23,4 \pm 7,6\%$.

Relajación vascular entre grupos ateroscleróticos (grupo 1 vs. grupo 2).

El comportamiento de la relajación vascular en estos dos grupos de conejos ateroscleróticos, muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en la RIE ($p=0,742$). El EC-50 del grupo 1 fue $-5,766$ Log M ($1,4 \times 10^{-6}$ M) y del grupo 2 fue $-5,766$ Log M ($1,7 \times 10^{-6}$ M) sin diferencia significativa ($p=0,995$). La RDE secundaria a la aplicación de Ach produjo una relajación máxima de $21,8 \pm 8,2$ en el grupo 1 y $17,6 \pm 7,8$ en el grupo 2 sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,181$).

Relajación vascular entre grupos sanos (grupo 3 vs. grupo 4).

El comportamiento de la relajación vascular en estos dos grupos de animales sanos, muestra diferencias

estadísticamente significativas en la RIE ($p = 0,036$) presentándose un mayor porcentaje de relajación en el grupo de conejos sanos sin EM-X. El EC-50 del grupo 3 fue de $-6,558 \text{ Log M}$ ($2,0 \times 10^{-7} \text{ M}$) y del grupo 4 fue de $-5,445 \text{ Log M}$ ($3,5 \times 10^{-6} \text{ M}$) con diferencias significativas ($p = 0,039$). La RDE fue de $62,8 \pm 40,8$ en el grupo 3 y de $23,4 \pm 7,6$ en el grupo 4 sin diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,349$).

Relación entre colesterol sérico, EM-X y función vascular

La regresión lineal entre la RDE y los niveles de colesterol sérico, muestra una relación negativa y significativa. Es decir, a mayores niveles de colesterol sérico, el porcentaje de RDE fue menor ($p = 0,003$) (Figura 2). Los resultados obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis indican que no hay un efecto del EM-X sobre la RDE ($p = 0,077$) (Figura 3), y el efecto del EM-X sobre la RIE fue estadísticamente significativo ($p = 0,034$) (Figura 4A). El resultado de la ANCOVA que evaluó el efecto del EM-X y del colesterol sobre el EC-50, indica que el nivel de colesterol sérico no tiene ningún efecto sobre el EC-50 ($p = 0,378$), mientras que el EM-X sí ($p = 0,036$). Este efecto se evidencia en las diferencias significativas existentes entre el grupo 3 y el 4 ($p = 0,039$) (Figura 4B).

Análisis histomorfométricos

Grupo 1: aterosclerosis con EM-X

Las características histomorfométricas de las lesiones fueron: área del vaso: $6,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$, área del lumen: $5,1 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ y área de la placa aterosclerótica: $0,75 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ (Figura 5A).

Grupo 2: aterosclerosis sin EM-X

Las características histomorfométricas de las lesiones fueron: área del vaso: $5,9 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ ($p = 0,57$), área del lumen: $4,89 \pm 0,7 \text{ mm}^2$ ($p = 0,89$) y área de la placa aterosclerótica: $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ ($p = 0,85$) (Figura 5B).

Grupo 3: control sin EM-X

Las características histomorfométricas de las lesiones fueron: área del vaso: $6,5 \pm 0,7 \text{ mm}^2$ y área del lumen: $5,3 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ y área de la placa aterosclerótica: $0,0 \mu\text{m}^2$ (Figura 5c).

Grupo 4: control con EM-X

Las características histomorfométricas de las lesiones fueron: área del vaso: $6,1 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ ($p = 0,61$), área del lumen: $5,1 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ($p = 0,88$) y área de la placa aterosclerótica: $0,0 \mu\text{m}^2$ ($p = 0,95$) (Figura 5d).

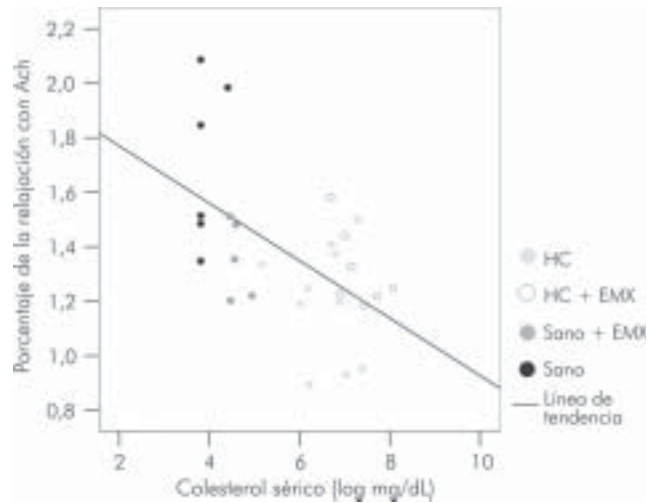


Figura 2. Relación entre el nivel de colesterol sérico y el porcentaje de relajación máxima con acetil-colina (logaritmizado). Verde: grupo de conejos con HC + EM-X; Azul: Sano sin EM-X; Gris: Sano + EM-X; Rojo: HC sin EM-X. Ach = Acetilcolina; HC = Conejos con hipercolesterolemia.

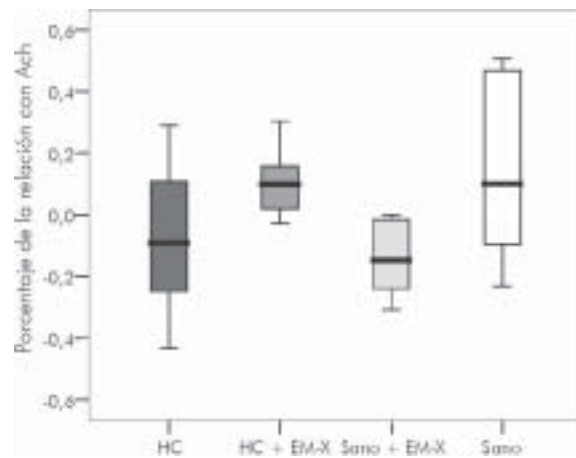


Figura 3. Efecto del EM-X sobre el porcentaje de relajación máxima con Ach. La figura muestra en el eje Y el efecto de la dieta y el EM-X sobre el porcentaje de relajación con Ach, cuando ha sido controlado de antemano el efecto del colesterol sérico. Ach = acetilcolina; HC = conejos con hipercolesterolemia.

Análisis de inmunohistoquímica

El análisis de inmunohistoquímica (Figura 6) mostró también presencia de células endoteliales teñidas con CD31 con un porcentaje de cobertura luminal en el grupo 1 de 93%, en el grupo 2 de 89%, en el 3 de 91% y en el 4 de 87%, sin diferencias significativas entre los cuatro grupos ($p = 0,85$).

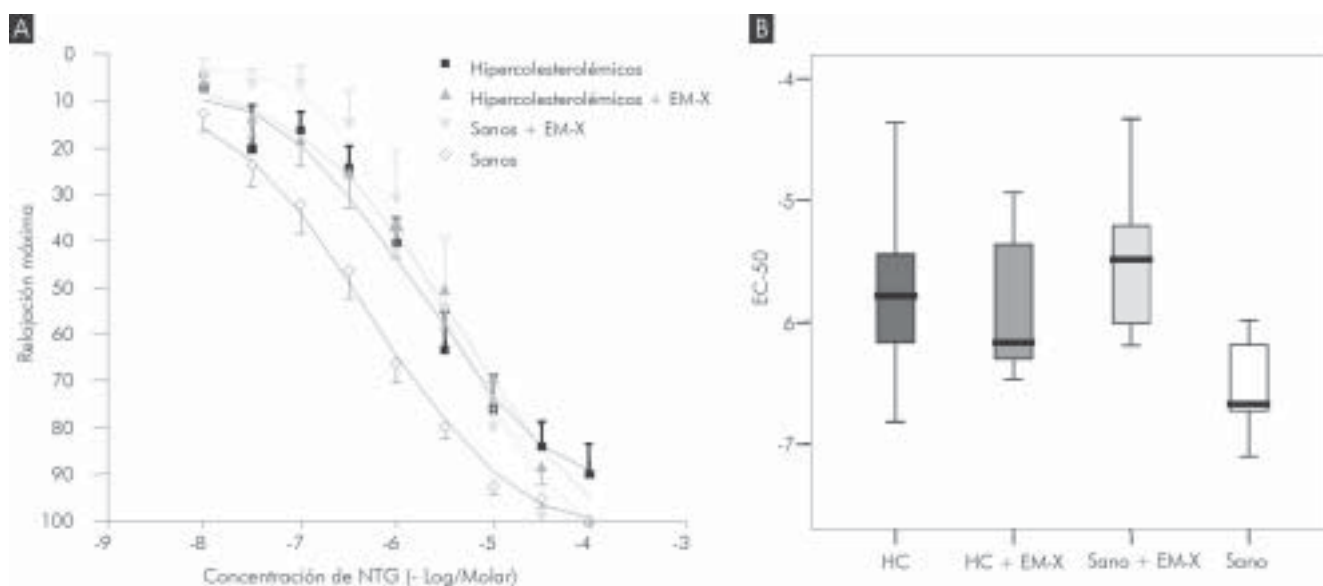


Figura 4. A Curva del porcentaje de relajación obtenido con dosis acumulativas de nitroglicerina (NTG) para los cuatro grupos evaluados. B Comparación del EC-50 de NTG obtenido para cada uno de los grupos evaluados. HC: conejo hipercolesterolémico. HC + EM-X: conejo hipercolesterolémico con administración de EM-X. Sano + EM-X: conejo sano con administración de EM-X. Sano: conejo sano. HC: conejos con hipercolesterolemia.

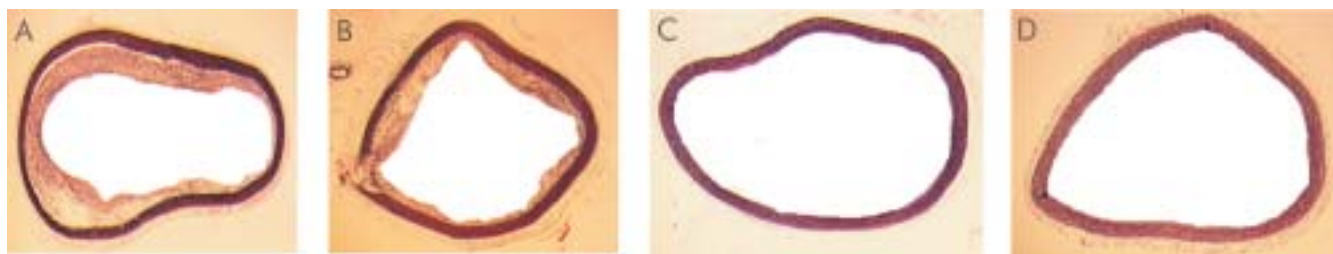


Figura 5. Segmentos de aorta torácica procedentes de conejos. El panel A, representa el grupo 1. Se observa un corte de arteria enferma con aterosclerosis temprana, tinción tricrómico elástica, 2X. El panel B, representa el grupo 2. Se observa un corte de arteria enferma con aterosclerosis temprana, tinción tricrómico elástica, 2X. En el Panel C, representa el Grupo 3. Se observa un corte de arteria sana, tinción tricrómico elástica, 2X. El panel D, representa el grupo 4. Se observa un corte de arteria sana, tinción tricrómico elástica, 2X.

Discusión

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial compleja, de la que inicialmente se pensaba (de forma simplista) se iniciaba por la captura de c-LDL dentro de la pared arterial, lo que daba como resultado la formación de una placa aterosclerótica (35, 36). Con el transcurrir de los años, el progreso de la lesión puede resultar en fisura, ruptura y formación de trombos con la consecuente manifestación clínica de angina de pecho, infarto agudo del miocardio, accidente cerebrovascular o muerte súbita (37, 38).

Muchas de las investigaciones recientes realizadas en la patogénesis de la aterosclerosis, se han centrado en el papel del estrés oxidativo local sobre el c-LDL. En 1979, Goldstein y colaboradores (39) fueron capaces de demostrar que las moléculas de c-LDL oxidadas eran rápidamente capturadas por monocitos/macrófagos y eran un factor importante para su diferenciación a células espumosas en la íntima arterial. El papel de la participación de tales lipoproteínas modificadas por la oxidación en la formación de la placa aterosclerótica, ha sido sugerido por estudios que muestran la presencia de

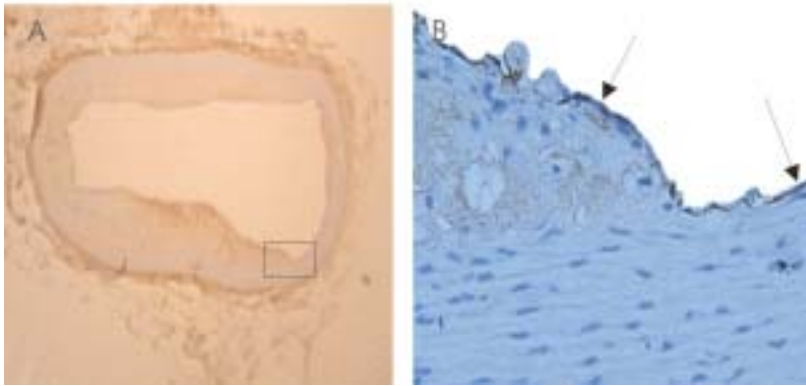


Figura 6. Segmentos de aorta torácica procedentes de conejos alimentados con fórmula comercial y suplemento de colesterol al 1%, durante 16 semanas. En el panel A se observa un corte de arteria enferma con aterosclerosis temprana, tinción CD31. 2X. En el panel B se observa el mismo corte de arteria enferma, tinción CD31. 60X. Nótese la presencia de células endoteliales en segmentos de la placa aterosclerótica temprana como en el segmento sano adyacente.

anticuerpos específicos contra c-LDLox en la placa (40), así como la identificación de productos que resultan de la oxidación de LDL tales como F2-isoprostanos e hydroxyeicosanoides (41-44). Mientras estos compuestos pueden representar marcadores de un daño oxidativo *in-vivo*, también poseen actividades biológicas relevantes en el proceso de la aterogénesis. La disfunción endotelial, la adherencia de células sanguíneas al endotelio y la activación de mediadores inflamatorios y la diferenciación de monocitos han sido ampliamente descritas (45-47).

La «hipótesis oxidativa» del proceso de aterosclerosis propone que la modificación oxidativa de los lípidos con formación local en partículas de c-LDL oxidadas, contribuye a la aterogénesis (47, 48). Los antioxidantes, que han sido efectivos contra la peroxidación de lípidos podrían así reducir el fenómeno de la aterosclerosis y ser potencialmente terapias de protección contra las enfermedades cardiovasculares (47).

La terapia con vitaminas antioxidantes, ha surgido como una posibilidad útil en la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis. Los grandes estudios clínicos prospectivos no demostraron ningún beneficio con el uso de una terapia antioxidante individual administrada sin una terapia hipolipemiente concomitante. Sin embargo, se ha planteado que el uso de las dos terapias combinadas (antioxidante e hipolipemiente) sí podría tener una interacción favorable. El estudio HATS (49), no mostró ningún beneficio significativo de un «cocktail» de vitaminas administrado en forma individual. Se ha llegado a plantear si las terapias combinadas podrían tener

un efecto adverso al reducir la acción hipolipemiente de la terapia lipídica. El *Heart Protection Study* (50) comparó las vitaminas antioxidantes versus sus placebos en un diseño factorial con simvastatina (40 mg/día) versus placebo. Este estudio tampoco mostró ningún beneficio cardiovascular (y no vascular) de una combinación de vitaminas similar a las combinaciones en HATS. Además, existió una ligera pero importante diferencia significativa entre la terapia antioxidante con vitaminas y el placebo en el análisis de c-LDL, TG y niveles de c-HDL ($p= 0,0001$). La totalidad de la evidencia de estudios realizados con vitaminas antioxidantes, demuestra que éstas no tienen beneficio en la población general con riesgo cardiovascular alto o bajo cuando se consumen para la prevención

de enfermedad vascular nativa o cáncer. Otras indicaciones propuestas en forma especial (51-55) requieren de un mayor estudio.

En contraste con los resultados anteriores, existe alguna evidencia clínica epidemiológica que afirma que los antioxidantes consumidos en la dieta o como suplementos, reducen el riesgo cardiovascular (56). Evidencia experimental da soporte a las propiedades antiaterogénicas de la vitamina E (57). Así mismo, se ha fallado en mostrar cualquier efecto benéfico en recientes estudios de intervención con vitamina E (58). Los suplementos prolongados de vitamina E no reducen la peroxidación lipídica en sujetos con factores de riesgo cardiovasculares mayores. La observación sobre la velocidad de peroxidación lipídica es cerca de lo normal en una gran población de sujetos, lo cual podría ayudar a explicar por qué la vitamina E no es efectiva como antioxidante y tampoco ha sido efectiva en estudios de prevención cardiovascular a gran escala (59).

A pesar de que la evidencia científica hasta el momento publicada no muestra beneficios de la terapia antioxidante sobre la aterosclerosis, no deja de ser llamativa la «hipótesis oxidativa» para continuar planteando nuevas formas de tratamiento. EM-X es una bebida antioxidante novedosa derivada del salvado de arroz y extractos de algas marinas que fueron fermentados con micro-organismos efectivos (EM). EM-X contiene más de 35 minerales, α -tocoferoles, lycopene, ubiquinona, saponina y flavonoides. Ha generado gran interés por su papel antioxidante y barredor de radicales libres *in-vitro* e *in-vivo* con potenciales efectos benéficos

para la salud humana. Se están llevando a cabo interesantes estudios en la validación de sus efectos en enfermedades como cáncer, asma, hepatotoxicidad, circulación sanguínea, modulación de citocinas, enfermedad dental y periodontal, infección (bacterias y virus), SIDA, dolor, alopecia, diabetes mellitus, colitis ulcerativa, artritis degenerativa y artritis reumatoide entre otros. Chui y colaboradores (52) demostraron que las altas concentraciones de EM-X, podrían tener una actividad inhibitoria de células cancerígenas en seno y leucemia, sugiriendo que el EM-X inhibe el crecimiento celular y reduce el potencial de generación de células de cáncer, posiblemente a través de una actividad anti-oxidante. Datta y colaboradores (61) describen que el EM-X tiene un efecto potencial neuroprotector en pacientes con enfermedad de Parkinson. Se han demostrado otros efectos benéficos anti-oxidantes a nivel de retina (62), riñón e hígado (63), e inhibición de la liberación de IL-8 y peroxidación de fosfolípidos *in-vitro* (64).

En este estudio, se procuró demostrar que la ingestión de EM-X previene la formación de placa aterosclerótica y favorece la relajación vascular *in-vitro*, aún en presencia de arterias enfermas con aterosclerosis y disfunción endotelial en un modelo de aterosclerosis temprana en conejos hipercolesterolémicos. Nuestros resultados no confirman esta hipótesis. Los conejos tratados con EM-X no mostraron beneficio en cuanto a las cifras de colesterol sérico, formación de placa aterosclerótica ni mejoría en la relajación vascular dependiente de endotelio.

Conclusión

La «hipótesis oxidativa», ha favorecido implementar nuevas terapias antioxidantes en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis. En nuestro estudio, no se demuestra beneficio del EM-X como terapia antioxidante en la prevención de placa aterosclerótica y en la relajación vascular dependiente de endotelio *in-vitro*, en un modelo experimental en conejos sanos o hipercolesterolémicos. Sin embargo, los resultados de efectos benéficos en otros estudios y patologías, sugieren que se deben hacer nuevos estudios en el área de la aterosclerosis, implementando nuevas dosis terapéuticas y mayores concentraciones en su consumo.

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud a la Fundación de Asesorías para el Sector Salud, FUNDASES, de la Universidad Minuto de Dios en Bogotá, por la asesoría técnica, el suministro del producto comercial EM-X y la financiación parcial de proyecto.

Bibliografía

1. Statistical Update. American Heart Association 2002. Heart and Stroke.
2. Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. Circulation 1998; 98: 2334-51.
3. Fuster V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges presented at the 71st. Scientific Sessions of the American Heart Association. Dallas, Texas. Circulation 1999; 99: 1132-7.
4. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. N Engl J Med 1993; 328: 1444-9.
5. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N Engl J Med 1993; 328: 1450-6.
6. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest 1991; 88: 1785-92.
7. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 1992; 13:341-90.
8. Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucoyl inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. J Clin Invest 1986; 77: 641-4.
9. Sparrow CP, Doebber TW, Olszewski J, Wu MS, Ventre J, Stevens KA, et al. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N-diphenylphenylenediamine. J Clin Invest 1992; 89: 1885-91.
10. Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D. Antiatherogenic effect of probuconol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 7725-9.
11. Sasahara M, Raines EW, Chait A, Carew TE, Steinberg D, Wahl PW, et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probuconol. I: is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? J Clin Invest 1994; 94: 155-64.
12. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. Br Heart J 1993; 69: 377-81.
13. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88: 8154-8.
14. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation 1995; 91: 2844-50.
15. Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. Circulation 1993; 87: 1781-91.
16. Brown BG, Gallery CA, Badger RS, Kennedy JW, Mathey D, Bolson EL, et al. Incomplete lysis of thrombus in the moderate underlying atherosclerotic lesion during intracoronary infusion of streptokinase for acute myocardial infarction: quantitative angiographic observations. Circulation 1986; 73: 653-61.
17. Guyton JR, Klemp KF. Development of the atherosclerotic core region: chemical and ultrastructural analysis of microdissected atherosclerotic lesions from human aorta. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1305-14.
18. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989; 320: 915-24.
19. Brown B, Zhao X-Q. Lipid-lowering therapy. In: Hennekens C, ed. Clinical Trials in Cardiovascular Disease. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1999. p. 199-216.
20. The Long-Term Intervention With Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease. N Engl J Med 1998; 339: 1349-59.
21. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 2000; 342: 154-60.
22. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSIP reversione trial. Lancet 1999; 354: 447-55.
23. Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Engl J Med 1994; 330: 1029-35.

24. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781-6.
25. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1145-9.
26. Deiana M, Assunta Dessi M, Ke B, Liang YF, Higa T, Gilmour PS, et al. The antioxidant cocktail effective microorganism X (EM-X) inhibits oxidant-induced interleukin-8 release and the peroxidation of phospholipids in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1148-51.
27. Sartippour MR, Heber D, Zhang L, Beatty P, Elashoff D, Aruoma OI, et al. The antioxidant cocktail, effective microorganism X (EM-X) protects retinal neurons in rats against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in vivo. *Free Radic Res* 2003; 37: 91-7.
28. Bin Ke, Teruo H, Zhengxian Z, Yunfei L. Antiaging activities of effective microorganisms extract (EM-X) on the fruit fly and the mouse. *J Snake* 2001; 13: 1-8.
29. Nobuyuki S, Teruo H. Research on the antioxidant components of EM-X and the mechanisms of action. Clinical and basic medical research on EM-X: The 1st. International EM Medical Conference International EM Medical Conference. Executive Committee Secretariat 2001: 27-39.
30. Del uso de animales vivos en experimentos e investigación. Diario oficial, Ley 84 de 1989. Capítulo VI: 3.
31. Echeverri D, Buitrago L, Montes FR, Delgadillo A, Guzmán N. La vasodilatación arterial obtenida in-vitro de la cafeína sugiere un efecto vasculoprotector. *Rev Col Cardiol* 2006; 12 (5): 263 (Abstract).
32. Buitrago L, Delgadillo A, Guzmán N, Fernández N, Mejía I, González MP, et al. Endothelial dysfunction induced by hipercolesterolemia: in vitro study in animal model. *Rev Med* 2005; 13 (1): 37-44.
33. Montes FR, Echeverri D, Buitrago L, Ramírez I, Giraldo JC, Maldonado JD, et al. Efecto vasodilatador del levosimendan sobre los conductos arteriales utilizados en cirugía de revascularización coronaria. *Rev Col Cardiol* 2006; 12 (5): 260 (Abstract).
34. Móntes F. Función endotelial in-vitro. En: Manual Básico de Investigación Experimental. Dario Echeverri. Bogotá, DC.: Ediciones Médicas Latinoamericanas S.A.; 2002. p. 107-14.
35. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidised lipoproteins in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med* 1996; 20: 707-27.
36. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17: 1859-67.
37. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebrough JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-50.
38. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebrough JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-8.
39. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein producing massive cholesterol deposition. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; 4: 3337.
40. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1994; 14: 605-16.
41. Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ, Kuhlmann H. Prostaglandin F2-like compounds, F2-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17: 3236-41.
42. Pratico D, Iuliano L, Mauriello A, et al. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2028-34.
43. Mallat Z, Nakamura T, Chan J, Leseche G, Tedgui A, Macclouf J, et al. The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 1999; 103: 4217.
44. Waddington E, Sienuarine K, Puddey I, Croft K. Identification and quantitation of unique fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2001; 292: 234-44.
45. Setty BN, Dampier CD, Stuart MJ. Arachidonic acid metabolites are involved in mediating red blood cell adherence to endothelium. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 608-17.
46. Powell WS, Gravel S, MacLeod RJ, Mills E, Hashemi M. Stimulation of human neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by metabolism independent of the leukotriene B4 receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 9280-6.
47. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408-16.
48. Jialal I, Fuller CJ, Huet BA. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1995; 15: 190-8.
49. Brown BG, Zhao X-Q, Chait A, et al. Simvastatin and niacin antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 1583-1592.
50. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 «high-risk» individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 23-33.
51. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in end stage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356: 1213-8.
52. Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB, Santoian EC, Cipolla GD, Tarazona N et al. Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury: a possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation* 1993; 88: 628-37.
53. Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, et al. Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Probucol Angioplasty Restenosis Trial. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 855-62.
54. O'Keefe JH Jr, Stone GW, McCallister BD Jr, Maddex C, Ligon R, Kacich RL, et al. Lovastatin plus probucol for prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1996; 77: 649-52.
55. Cote G, Tardif JC, Lesperance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, et al. Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty: Multivitamins and Protocol Study Group. *Circulation* 1999; 99: 30-5.
56. Marchioli R. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacol Res* 1999; 40: 227-38.
57. Pratico D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med* 1998; 4: 1189-92.
58. Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 603-7.
59. Chiabrando Ch, Avanzini F, Rivalta C, et al. for PPP Collaborative Group on the antioxidant effect of vitamin E Long-term vitamin E supplementation fails to reduce lipid peroxidation in people at cardiovascular risk: analysis of underlying factors. *Curr Controlled Trials Cardiovasc Med* 2002; 3: 1-7.
60. Chui CH, Cheng GY, Ke B, et al. Growth inhibitory potential of effective microorganism fermentation extract (EM-X) on cancer cells. *Int J Mol Med* 2004; 14: 925-9.
61. Datta KP, Bennett RD, Zbarsky V, et al. The antioxidant drink effective microorganism-X (EM-X) pre-treatment attenuates the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesion rat model of Parkinson's disease. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 649-54.
62. Aruoma OI, Moncaster JA, Walsh DT, Gentleman SM, Ke B, Liang YF, et al. The antioxidant cocktail, effective microorganism X (EM-X), protects retinal neurons in rats against N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in vivo. *Free Radic Res* 2003; 37: 91-7.
63. Aruoma OI, Deiana M, Rosa A, et al. Assessment of the ability of the antioxidant cocktail-derived from fermentation of plants with effective microorganisms (EM-X) to modulate oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of poly- and mono-unsaturated fatty acids. *Toxicol Lett* 2002; 135: 209-17.
64. Deiana M, Dessi MA, Ke B, et al. The antioxidant cocktail effective microorganism X (EM-X) inhibits oxidant-induced interleukin-8 release and the peroxidation of phospholipids in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1148-51.