



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  
S-NITROSOGLUTATIÓN REDUCTASA  
EN PLAQUETAS DE PACIENTES CON ASMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**LILIANA ROXANA SEVILLA VARGAS**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Jurado asignado

Presidente	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Secretario	Prof. Alberto Martín Guzmán Grenfell
1er. Suplente	Prof. Marta Alicia Menjívar Iraheta
2º. Suplente	Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

## Sitio en donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas".

## Asesor del tema

---

Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell

## Sustentante

---

Liliana Roxana Sevilla Vargas

**La presente tesis se realizó en:**

El Laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental en colaboración con la Clínica de Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas"; México, D. F.

**Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
(CONACYT)**

Beca del Proyecto TLEGUZGA93 No. 52066

## **Agradecimientos**

Por la dirección de tesis:

Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell  
Investigador en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias (INER), “Ismael Cosío Villegas”

Por sus valiosos comentarios y apoyo a la presente tesis:

M. en IA. María Angélica Velázquez González

Por el apoyo y las facilidades otorgadas:

Dr. Juan José Hicks Gómez  
Jefe del Laboratorio de Bioquímica Inorgánica y Medicina Ambiental del Instituto  
Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), “Ismael Cosío Villegas”

Por el apoyo y las facilidades otorgadas:

Dra. Rocío Chapela Mendoza  
Jefe de la Clínica de Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
(INER), “Ismael Cosío Villegas”

Por sus valiosos comentarios y apoyo a la presente tesis:

Dra. Martha Patricia Sierra Vargas

Por sus valiosos comentarios y apoyo a la presente tesis:

Dra. Yessica Dorin Torres Ramos

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), “Ismael Cosío Villegas”, por el apoyo institucional, acceso a las instalaciones y por su valiosa cooperación para la realización de la presente tesis.

Por el apoyo profesional al equipo del Laboratorio de Bioquímica y Medicina Ambiental, y a la Clínica de Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), “Ismael Cosío Villegas”

A los miembros del jurado asignado para la revisión del documento de tesis y del examen profesional, por sus valiosos comentarios y observaciones que enriquecieron el presente documento y mi formación académica:

Dr. Homero Hernández Montes

Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra

Dra. Martha Menjívar Iraheta

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo otorgado y mi formación profesional.

A la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo otorgado y mi formación profesional

## Dedicatorias

A Dios por darme fuerza y voluntad para concluir esta etapa de mi vida.

A la memoria de mi padre Alberto Sevilla Mejía<sup>†</sup>, por haberme apoyado incondicionalmente durante toda su vida y darme sus enseñanzas, hoy confieso que me haces mucha falta en cada día que pasa y en cada palpitar de mi corazón, pero se que desde donde estás siempre serás el ángel que me guiará en cada momento de mi vida.

A mi madre Dolores Vargas Sánchez, que con su sacrificio y apoyo incondicional me ha dado fortaleza en los momentos en que sentía que ya no podía continuar, eres la mano amiga que siempre ha creído en mí, no se como lo haces, pero siempre estás presente cuando más te he necesitado.

A mis abuelitos Juana Sánchez Juárez y Magdaleno Vargas Álvarez<sup>†</sup>, porque siempre estuvieron conmigo sin importar lo que pasara, gracias por gran su amor y confianza en mí.

Al Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell, por asesorarme y apoyarme a lo largo de esta tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina: “Muchas gracias, maestro”.

A la M. en IA. María Angélica Velázquez González, por brindarme su amistad, apoyo, comprensión, paciencia, interés y facilidades que en todo momento otorgó para la realización de la presente tesis.

A la Dra. Rocío Chapela Mendoza y al Dr. Ignacio Páramo por brindarme su amistad, apoyo, interés y consejos cuando más lo necesitaba.

Al Dr. Gustavo Acosta Altamirano y al Dr. Oscar Ramírez Aponte por ser unas personas a quienes estimo mucho y que siempre me han motivado a seguir adelante.

A la Psicóloga Mónica Méndez Guerra por brindarnos su amistad y apoyarnos a mi mamá y a mí en estos momentos tan difíciles.

Con respeto y admiración a todos mis profesores de la carrera de Química Farmacéutica–Biológica por haberme guiado y transmitido sus conocimientos, los cuales, han sido parte de mi formación profesional.

A los Doctores Sergio Mateos Cortés, Susana Alicia Flores Almazán, María del Socorro Alpízar Ramos, Guadalupe Reyes, Fernando García Tamayo, Magdalena Acosta, Mercedes Catalina González Meza, Miriam Muñoz, Ricardo Flores Hernández, Marina Gavilanes Ruiz, Santiago Ávila, Ruth Martín, Alejandro Camacho, Ernestina Cervera, Elia Brosla, Ruth Bustamante, Alejandro Ortiz, Pedro Villanueva, Fernando Montiel, Misael González Ibarra, Honoria Sixtos, Manuel Aguilar y Daniel Coello, por creer en mí, por brindarme su amistad, su confianza y su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A mis amigos Cinthia Álvarez, Carolina Martínez, Angélica Velázquez, Michelle Haselback, Dámaris Romero, Araceli Montoya, Yessica Ramos, Esmeralda Carranza, Fátima Lino, Griselle Hinojosa, Selene, Mónica Luna, Karla García, Karina Vázquez, Karina Maldonado, Carmen Flores, María del Carmen Martínez, Jacqueline Larracilla, Berenice Leyva, Mayra, Verónica, Esther Chavarría, Lorena, Myrna, Julia Sabido, Arturo Hurtado, Edgar Romero, Pablo Vanegas, Juvenal Villalpando, José Antonio Cuanalo, Samuel García, Edgar Méndez, Christian Tecla, José Luis Ángeles, Enrique, Marino, Alfonso Hernández, Mauricio Cortés, Juan Robles, a la estudiantina de la Preparatoria N° 5 “José Vasconcelos”, a la Tuna del Centro Universitario Cultural (CUC), a las estudiantinas de la Facultad de Química, Economía, Psicología, Veterinaria y Derecho, gracias por permitirme

conocerlos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por brindarme su amistad, su cariño, sus sonrisas, su música, por compartir momentos inolvidables y ser parte de mi vida.

A las maestras María del Carmen Madrigal y Guadalupe Hernández por brindarnos su amistad, apoyo, cariño y comprensión a mi mamá y a mí en los buenos y malos momentos de nuestra vida.

A la Sra. Sara Sánchez por brindarnos su amistad, apoyo, cariño y comprensión a toda mi familia, principalmente a mi mamá y a mí en los buenos y malos momentos de nuestra vida.

A Martha Munguía y Yolanda Arce (Yolita) por escucharme y darme sus buenos consejos durante todo este tiempo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de la presente tesis y a mi formación académica y profesional: ¡Gracias a todos por ayudarme a alcanzar mi meta!

## Éxito

Si piensas que estás vencido, lo estás.

Si piensas que no te atreves, no lo harás.

Si piensas que te gustaría ganar, pero no puedes, no lo lograrás.

Si piensas que perderás, ya has perdido.

Porque en el mundo encontrarás que el éxito comienza con la voluntad del hombre.

Todo está en el estado mental  
porque muchas carreras se han perdido  
antes de haberse corrido  
y muchos cobardes han fracasado  
antes de haber empezado su trabajo.

Piensa en grande y tus hechos crecerán.

Piensa en pequeño y quedarás atrás.

Piensa que puedes y podrás.

La batalla de la vida no siempre  
la gana el más fuerte o el más ligero,  
porque tarde o temprano el hombre que gana  
es el que cree poder hacerlo.

*Dr. Christian Barnard*

El éxito es determinado por los que prueban el imposible, posible.

*Arnold H. Grasow*

El éxito no se logra sólo con cualidades especiales, es sobre todo un trabajo de constancia, de método y de organización.

*J. P. Sergeant*

## Resumen

El asma es un padecimiento inflamatorio crónico de las vías respiratorias y una de sus características es la generación exacerbada de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERON) por diversos tipos celulares del sistema respiratorio, leucocitos y plaquetas, las cuales contribuyen a la condición de estrés oxidativo asociado al asma <sup>35, 73</sup>.

Los nitrosotioles han sido considerados formas estables del NO<sup>\*</sup>, ya que tienen una vida media mucho mayor que el óxido nítrico en condiciones fisiológicas y pueden liberar a este radical libre en condiciones reductoras. Por otro lado, los nitrosotioles, especialmente el S-nitrosoglutatión (GSNO), tiene efectos específicos que incluso parecen ser independientes de su capacidad de liberar al óxido nítrico. En el pulmón, el GSNO juega un papel importante en la fisiología de este órgano y existen evidencias importantes de que su concentración se encuentra disminuida en las vías aéreas de pacientes con asma, probablemente por una elevada actividad de la enzima S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR); hecho que se ha vinculado con los episodios de bronco-constricción que se presentan en el asma <sup>60, 64</sup>.

La plaqueta humana posee un metabolismo del óxido nítrico importante, incluso existen evidencias de tener la capacidad de liberar NO<sup>\*</sup> a partir de GSNO, pero se desconoce si está dotada de la enzima GSNOR <sup>46</sup>. La hipótesis propuesta para el presente trabajo es que si en la plaqueta humana existe la enzima GSNOR, entonces, ésta se encontrará incrementada en individuos con asma bronquial.

La metodología que se desarrolló en el presente estudio, la cual comprende la obtención de las muestras de eritrocitos, plasma sanguíneo y plaquetas de sangre periférica de individuos sanos provenientes del Banco de Sangre (grupo control) y de pacientes con asma provenientes de la Clínica de Asma (grupo de asma), los cuales son atendidos en el INER.

A dichas muestras se les determinaron los grupos sulfhidrilos totales, no proteicos y proteicos mediante el reactivo de Ellman (ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), también se les midió la actividad de la enzima S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) en plaquetas por un método espectrofotométrico, utilizando S-nitrosoglutatión y NADH como sustratos.

Los resultados obtenidos muestran que hay un incremento en el grupo de asma en las determinaciones de los sulfhidrilos no proteicos en eritrocito y en plaqueta, probablemente por un incremento en la síntesis del glutatión reducido y como una respuesta compensatoria al estrés oxidativo crónico presente en el asma. La plaqueta esta dotada de una actividad de la enzima S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) la cual fue menor en las plaquetas del grupo de asma, probablemente esto represente una menor capacidad de liberar óxido nítrico a partir de S-nitrosoglutatión por parte de la plaqueta de pacientes con asma.

# Índice

	Página
Resumen	I
Índice	III
Índice de tablas, diagramas y figuras	VI
Abreviaturas	X
1. Introducción	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general	2
1.2.2 Objetivos particulares	2
1.3 Hipótesis	2
1.4 Justificación	3
2. Antecedentes	4
2.1 Asma	4
2.1.1 Clasificación del asma	5
2.1.2 Crisis de asma	6
2.1.3 Epidemiología	8
2.1.4 Contaminación y factores predisponentes en el asma	11
2.1.5 Patogénesis del asma	13
2.1.5.1 Músculo liso bronquial	16
2.1.5.2 Epitelio bronquial	16
2.1.5.3 Mecanismos neurales	17
2.1.5.4 Células inflamatorias	18
2.1.5.5 Células cebadas	18
2.2 Estrés oxidativo	20
2.3 Óxido nítrico	22
2.3.1 Biosíntesis	23
2.4 Grupos sulfhidrilos	24

---

2.4.1 Estructura y biosíntesis del glutatión (GSH)	25
2.4.2 Funciones del GSH en la célula	27
2.4.3 Acción redox del GSH (función antioxidante)	28
2.4.4 Vías metabólicas del GSH en las células	29
2.4.5 S–nitrosación como proceso de regulación	31
2.4.6 Sistemas enzimáticos que liberan o destruyen el óxido nítrico del S–nitrosoglutatión	33
2.5 Plaquetas	35
3. Parte experimental	38
3.1 Diseño del estudio	38
3.2 Equipos	39
3.3 Preparación de soluciones y de las muestras	39
3.4 Procedimiento	39
3.5 Análisis estadístico	41
4. Resultados y discusión	42
4.1 Características generales del grupo de asma	42
4.2 Contenido de sulfhidrilos en el eritrocito, en la plaqueta y en el plasma sanguíneo	42
4.2.1 Contenido de sulfhidrilos en el eritrocito humano	43
4.2.2 Contenido de sulfhidrilos en la plaqueta humana	44
4.2.3 Contenido de sulfhidrilos en el plasma sanguíneo	46
4.3 Determinación de la actividad de la enzima GSNOR	47
4.4 Correlaciones	49
4.5 Discusión de resultados	53
5. Conclusiones	56
5.1 Perspectivas	56
6. Apéndice	57
6.1 Preparación de las muestras	57
6.1.1 Preparación del lisado de plaquetas	58
6.2 Determinación de la concentración de plaquetas	58
6.3 Determinación de grupos sulfhidrilos	60

---

6.3.1	Fundamento	60
6.4	Determinación de grupos sulfhidrilos en eritrocito	61
6.4.1	Determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito	61
6.4.2	Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en eritrocito	64
6.4.3	Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito	64
6.4.4	Determinación de oxihemoglobina (HbO <sub>2</sub> )	67
6.4.5	Determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta	68
6.4.6	Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en plaqueta	71
6.4.7	Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plaqueta	71
6.4.8	Determinación de grupos sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo	72
6.4.9	Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo	73
6.4.10	Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo	73
6.4.11	Determinación de proteínas por el método de Folin–Fenol (Lowry)	74
6.5	Determinación de la actividad enzimática de GSNOR	76
6.6	Determinación de ENO	79
6.7	Preparación de soluciones	79
7.	Bibliografía	85

## Índice de tablas, diagramas y figuras

	Página	
Tabla 1	Clasificación del asma según GINA	5
Tabla 2	Niveles de control del asma	6
Tabla 3	Clasificación de la crisis de asma	7
Tabla 4	Mediadores del proceso inflamatorio provenientes de células cebadas	19
Tabla 5	Células reclutadas durante la inflamación	20
Tabla 6	Características generales del grupo de asma	42
Tabla 7	Resumen general de parámetros estudiados	48
Tabla 8	Correlaciones entre GSNOR y ENO contra los sulfhidrilos en plaquetas	52
Tabla 9	Valores de la curva estándar para determinar la concentración de plaquetas	59
Tabla 10	Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito	61
Tabla 11	Preparación de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito	62
Tabla 12	Valores de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito	62
Tabla 13	Preparación de las muestras para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito	65
Tabla 14	Preparación de la curva estándar para la determinación de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito	66
Tabla 15	Determinación de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito	66
Tabla 16	Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta	68
Tabla 17	Preparación de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta	69

Tabla 18	Valores de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta	69
Tabla 19	Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo	72
Tabla 20	Preparación de la muestra de plasma sanguíneo para la determinación de proteínas	75
Tabla 21	Preparación de la curva estándar para la determinación de proteínas	75
Tabla 22	Valores de la curva estándar para la determinación de proteínas	75
Tabla 23	Preparación de la muestra para la determinación de la actividad de la enzima GSNOR	77
Diagrama 1	Metodología empleada	40
Figura 1	Mortalidad del asma	8
Figura 2	Prevalencia del asma	9
Figura 3	Morbilidad del asma en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).	11
Figura 4	Factores predisponentes en el asma	12
Figura 5	La herencia como factor predisponente	13
Figura 6	Cambios patológicos en el asma. Diagrama de un corte de una vía aérea en el asma severa	15
Figura 7	Características histopatológicas del asma bronquial	15
Figura 8	Mediadores de la inflamación	18
Figura 9	Eventos oxidativos y nitrosantes en el asma	22
Figura 10	Reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa	24
Figura 11	Estructura del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG)	26
Figura 12	Síntesis del glutatión como parte del ciclo del $\gamma$ – glutamilo del metabolismo del glutatión	27

Figura 13	Oxidación del GSH	28
Figura 14	Reducción del GSSG	29
Figura 15	Esquema de la plaqueta humana	36
Figura 16	Procesos fisiológicos y patológicos en los que las plaquetas están involucradas	37
Figura 17	Sulfhidrilos totales en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma	43
Figura 18	Sulfhidrilos proteicos en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma	43
Figura 19	Sulfhidrilos no proteicos en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma	44
Figura 20	Sulfhidrilos totales en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma	44
Figura 21	Sulfhidrilos proteicos en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma	45
Figura 22	Sulfhidrilos no proteicos en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma	45
Figura 23	Sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma	46
Figura 24	Sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma	46
Figura 25	Sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma	47
Figura 26	Actividad de la enzima GSNOR en el grupo control y el grupo de asma	47
Figura 27	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR	49
Figura 28	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR	49
Figura 29	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR	50

---

Figura 30	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y el ENO	50
Figura 31	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y el ENO	51
Figura 32	Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y el ENO	51
Figura 33	Gráfico de correlación entre el ENO y la actividad de la enzima GSNOR	52
Figura 34	Curva estándar para determinar la concentración de plaquetas	59
Figura 35	Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito	63
Figura 36	Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito	66
Figura 37	Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta	69
Figura 38	Curva estándar para la determinación de proteínas en plasma sanguíneo	76
Figura 39	Actividad enzimática de GSNOR expresada en $-\Delta\text{As}/\text{min}$	78
Figura 40	Espectro de absorción del S-nitrosoglutatión (GSNO)	84

## Abreviaturas

ADH–III	Alcohol deshidrogenasa clase III
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
As	Absorbencia
ATP	Adenosín trifosfato
AVAD	Años de vida ajustados en función de la discapacidad del mundo
BSA	Albúmina de suero bovino
BSA–SNO	S–nitrosotiol de la albúmina de suero bovino
C	Concentración
° C	Grado Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CAL	Calmodulina
CO•	Monóxido de carbono, óxido carbonoso
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono, óxido carbónico
CRC	Canal liberador de calcio cardiaco
csPDI	Células de superficie de la proteín disulfuro isomerasa
Cys	Cisteína
DMB	Ácido 3, 5–dimaleimil benzoico
DTNB	Ácido 5, 5'-ditiobis–2–nitrobenzoico
ECF	Factor quimiotáctico para eosinófilos
ECP	Proteína catiónica eosinófila
EDNT	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ENO	Óxido nítrico expirado
EPO	Peroxidasa de los eosinófilos
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ERON	Especies reactivas del nitrógeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido oxidado

---

Fe <sup>2+</sup>	Ion ferroso
FEM	Frecuencia espiratoria máxima
FEV <sub>1</sub>	Volumen espiratorio forzado del primer segundo
FMN	Flavín mononucleótido
<i>g</i>	Unidad <i>g</i> , unidad de aceleración
GGT	γ-glutamyl transpeptidasa
GINA	Global Initiative for Asthma
Gly	Glicina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos / macrófagos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GS-FDH	Glutación dependiente de la formaldehído deshidrogenada
GSH	γ-glutamyl-cisteinil-glicina, glutación reducido
GSH-Px	Glutación peroxidasa
GSNO	S-nitrosoglutación
GSNOR	S-nitrosoglutación reductasa
GSSG	Glutación disulfuro, glutación oxidado
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>4</sub> B	6-R-tetrahidrobiopterina
Hb	Hemoglobina
Hb-SNO	S-nitrosotiol de la hemoglobina
HbO <sub>2</sub>	Oxihemoglobina
HbO <sub>2</sub> -SNO	S-nitrosotiol de la oxihemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
HO•	Radical hidroxilo
HOBr	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

---

iNOS	Isoenzima de la óxido nítrico sintasa
IPN	Instituto Politécnico Nacional
ISAAC	Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K <sub>Ca</sub>	Canal de potasio dependiente de calcio
L-CySH	L-cisteína
L-Glu	L-glutamato
L-GluCySH	L-glutamil-cisteína
LT	Leucotrieno
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
MPO	Mieloperoxidasa de los neutrófilos
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NANC	Inervación no adrenérgica no colinérgica, inervación nitrérgica
NaOH	Hidróxido de sodio
NH <sub>3</sub>	Amonio
NO <sup>-</sup>	Anión nitroxilo
NO <sup>+</sup>	Catión nitrosonio
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PaCO <sub>2</sub>	Presión parcial arterial de dióxido de carbono

---

PAF	Factor activador de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDI	Proteín disulfuro isomerasa
PEF	Flujo espiratorio máximo
PG	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Fosfato
PM	Material particulado
P.M.	Peso molecular
PPP	Plasma pobre en plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
ROH	Grupo alcohol
rpm	Revoluciones por minuto
RSH, –SH, SH	Grupo sulfhidrilo, grupo tiol
RSNO	S–nitrosotioles
Se	Selenio
SN	Sobrenadante
SOD	Superóxido dismutasa
SpO <sub>2</sub>	Saturación arterial de oxígeno
TCA 20%	Ácido tricloroacético al 20%
TGF–β	Factor de crecimiento transformante β
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRIS	Tris–hidroximetil aminometano
Tx 100	Tritón X–100
TxA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
UICTER	Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias
β–TG	β–tromboglobulina
ε	Coefficiente de extinción molar

## 1. Introducción

### 1.1 Planteamiento del problema

Desde hace tiempo existen evidencias de la participación del S-nitrosoglutatión (GSNO) en la regulación del tono de las vías aéreas y de una disminución de este derivado del óxido nítrico en pacientes con asma bronquial, una enfermedad caracterizada por inflamación e hiperactividad bronquial con bronco-constricción. Esto ha permitido a algunos grupos de investigadores, postular la hipótesis de que en las vías aéreas de los pacientes con asma se presenta una excesiva “degradación” de GSNO lo cual contribuye al estado de hiperreactividad bronquial característico de esta enfermedad. Existen evidencias de la existencia de un sistema enzimático, conocido como S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR), cuya actividad está incrementada en el asma, favoreciendo la disminución en la disponibilidad de S-nitrosoglutatión (un bronco-relajante) para controlar el tono bronco-alveolar. Esta condición participa en la bronco-constricción asociada a esta enfermedad. Sin embargo, por las dificultades técnicas y aspectos éticos para la obtención de biopsias de pulmón de pacientes, la mayor parte de estos estudios se han realizado en modelos animales. Por ello, resulta necesario determinar si existen otros tipos de células más accesibles, pero a la vez también dotadas de las vías metabólicas vinculadas con el óxido nítrico y los S-nitrosotioles, a la vez que intervengan en esta enfermedad para este tipo de estudios. Un ejemplo de este tipo de células es la plaqueta humana, la cual posee un metabolismo del óxido nítrico importante, incluso existen evidencias de tener la capacidad de liberar NO<sup>•</sup> a partir de GSNO<sup>62</sup>, pero se desconoce si está dotada de la enzima GSNOR.

Por otro lado, en los estudios realizados por Nadeem et al.<sup>55</sup>, se ha vinculado el asma con un incremento en algunos parámetros de estrés oxidativo tales como la disminución de los sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo; adicionalmente también se ha documentado un incremento en la concentración de glutatión total

de sangre periférica. Sin embargo se desconoce si esto corresponde a un incremento en el glutatión reducido en alguno de los componentes sanguíneos (eritrocitos, plaquetas y plasma sanguíneo) de pacientes con asma.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Determinar la existencia de la enzima S–nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) en la plaqueta humana.

### **1.2.2 Objetivos particulares**

- a) Identificar si en las plaquetas de pacientes asmáticos existe una modificación en la actividad de la enzima S–nitrosoglutatión reductasa (GSNOR), con respecto a individuos no asmáticos.
  
- b) Estudiar la concentración total de sulfhidrilos en algunos de los componentes sanguíneos (eritrocitos, plaquetas y plasma sanguíneo) de pacientes asmáticos, con respecto a individuos no asmáticos, para buscar una posible correlación con el estrés oxidativo asociado a esta enfermedad.

## **1.3 Hipótesis**

- a) En la plaqueta humana existe la enzima GSNOR, la cual se espera que se encontrará incrementada en pacientes con asma, con respecto a individuos no asmáticos.

b) Debido a la condición de estrés oxidativo que prevalece en el paciente con asma, el contenido de sulfhidrilos se encontrará disminuido en algunos de los componentes sanguíneos (eritrocitos, plaquetas y plasma sanguíneo) de pacientes con asma, con respecto a individuos no asmáticos.

#### **1.4 Justificación**

El asma bronquial, es una enfermedad que afecta del 10 al 12% de la población mundial. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima aproximadamente 300 millones de asmáticos en el mundo, por lo que se considera un importante problema de salud pública. Por otro lado, esta enfermedad también se encuentra asociada a problemas de contaminación del aire (contaminación extramuros), tabaquismo (contaminación intramuros), factores genéticos, atopia, dieta, ocupación, infecciones respiratorias y factores socio-económicos, los cuales no sólo contribuyen al desarrollo de la enfermedad, sino que también intervienen en el rubro de riesgo de mortalidad. Por lo cual, el estudio de aspectos específicos relacionados con la fisiopatología de esta enfermedad, seguramente contribuirá a un mejor entendimiento y por lo tanto, a mejores tratamientos de la misma.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Asma

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas asociada a obstrucción variable del flujo aéreo – generalmente reversible, espontáneamente o por tratamiento –, y a un incremento en la reactividad de las vías aéreas a una variedad de estímulos <sup>67</sup>.

En asma, el consenso más importante es la Global Initiative for Asthma (GINA, por sus siglas en inglés). En nuestro país se ha establecido el Consenso Mexicano de Asma y también se utiliza el de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y las Enfermedades Respiratorias (UICTER) <sup>16</sup>.

La definición del padecimiento según GINA, llamada en UICTER definición técnica es: “El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que intervienen diferentes tipos de células. Esta inflamación crónica provoca un aumento de la hiperreactividad de las vías aéreas, que conduce a episodios de sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, especialmente por las noches o en la madrugada. Estos episodios se asocian habitualmente con una obstrucción de las vías aéreas generalizada pero variable, que a menudo es reversible ya sea de forma espontánea o mediante tratamiento <sup>24</sup>.

Actualmente se sabe que los ataques repetidos de asma ocasionan daño permanente en la vía aérea, llamado remodelación, el cual se manifiesta como hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa, hiperplasia epitelial, engrosamiento de la membrana basal epitelial asociada con depósito de inmunoglobulinas, fibronectina y colágenas tipo I y III, lo cual debe quedar claro cuando se detecta este padecimiento, ya que es imprescindible que todos los involucrados en el manejo del paciente asmático conozcan la naturaleza real del problema <sup>30</sup>.

### 2.1.1 Clasificación del asma

Con base en los criterios clínicos y funcionales, la enfermedad puede clasificarse en cuatro tipos: asma leve intermitente, asma leve persistente, asma moderada persistente y asma grave persistente (Ver Tabla 1)<sup>24</sup>.

Tabla 1 Clasificación del asma según GINA<sup>24</sup>

	Asma Leve Intermitente	Asma Leve Persistente	Asma Moderada Persistente	Asma Grave Persistente
Frecuencia de síntomas	= < 2 veces por semana Asintomático entre exacerbaciones	2 veces por semana pero < 1 vez al día	Diariamente	Continuos
Intensidad de exacerbaciones	Breves y leves	Pueden afectar la actividad y el sueño	Afectan las actividades y el sueño Exacerbaciones = > 2 veces a la semana, pueden durar días	Actividad física limitada Las exacerbaciones pueden ser frecuentes
Síntomas nocturnos	= < 2 veces por semana	> 2 veces al mes	> 1 vez a la semana	Frecuentes
FEV <sub>1</sub> (Volumen espiratorio forzado del primer segundo)	= > 80 % del predicho	= > 80 % del predicho	> 60 % e = < 80 % del predicho	= < 60 % del predicho
FEM (Frecuencia espiratoria máxima)	= > 80 % del predicho Variabilidad < 20 %	= > 80 % del predicho Variabilidad 20 – 30 %	> 60 % e = < 80 % del predicho Variabilidad > 30 %	= < 60 % del predicho Variabilidad > 30 %

Recientemente la GINA ha propuesto una forma de clasificar a los pacientes de acuerdo con el nivel de control en el que se encuentre. De acuerdo con esta clasificación los pacientes pueden ser clasificados como controlados, parcialmente controlados y no controlados. El nivel de control determinará el tratamiento y seguimiento de cada paciente (Ver Tabla 2)<sup>24</sup>.

Tabla 2 Niveles de control del asma <sup>24</sup>

Característica	Controlado	Parcialmente Controlado	No Controlado
Síntomas durante el día	Síntomas durante el día	Más de 2 veces por semana	Tres o más características de parcialmente controlado en cualquier semana
Limitación de las actividades	No	Sí	Sí
Síntomas nocturnos	No	Sí	Sí
Uso de medicamentos de rescate	No (menos de 2 veces por semana)	Más de 2 veces por semana	Más de 2 veces por semana
Función pulmonar FEV <sub>1</sub> o FEM	Normal	< 80 % del predicho	< 80 % del predicho
Exacerbaciones	Ninguna	Una o más por año	Una en cualquier semana

### 2.1.2 Crisis de asma

Se llama *crisis de asma* a un aumento de los síntomas rápidamente creciente (minutos, horas o días), con una disminución importante del flujo aéreo. Al aumentar la inflamación bronquial y la contracción muscular, aumenta la obstrucción. Como consecuencia, la ventilación pulmonar se hace cada vez más difícil, sobre todo en las vías aéreas pequeñas, y empieza a retenerse aire mal ventilado en los pulmones <sup>9</sup>.

El paciente siente cada vez más disnea, por lo que utiliza espontáneamente las estrategias naturales para mejorar la ventilación: Usa músculos accesorios, se sienta en vez de permanecer acostado, espira forzosamente, prolonga la espiración y aumenta la frecuencia respiratoria. Si la obstrucción aumenta, se compromete la vida por retención de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y disminución de la oxigenación <sup>9</sup>.

Los datos que anticipan una crisis son: Aumento de la disnea, tos y expectoración, aumento de sibilancias, despertares nocturnos o en la madrugada, incremento del uso de broncodilatadores, disminución de la capacidad para hacer esfuerzos y aumento de la diferencia entre el FEM de la mañana y el de la tarde. En la Tabla 3 se describe la clasificación de la crisis de asma según GINA <sup>9</sup>.

Tabla 3 Clasificación de la crisis de asma <sup>9</sup>

Signo	Leve	Moderado	Grave	Paro inminente
Disnea	Al caminar puede estar acostado	Al hablar, prefiere estar sentado	Estando acostado	
Puede hablar en:	Frases	Partes de frases	Palabras	No puede hablar
Nivel de conciencia	Puede estar agitado	Habitualmente agitado	Siempre agitado	Somnoliento o confuso
Frecuencia respiratoria	Aumentada	Aumentada	A menudo >30/min	Bradipnea
Tiraje muscular	No	Habitualmente	Habitualmente	Movimiento paradójico
Sibilancias	Moderadas, espiratorias	Fuertes	Muy fuertes	Ausentes
Pulso/minuto	< 100	100 – 200	> 120	Bradicardia
Pulso paradójico	Ausente	< 10 mmHg	10 – 25 mmHg	
PEF (Flujo espiratorio máximo) posbroncodilatador	> 80%	60 – 80 %	< 60 %	
PaCO <sub>2</sub> (Presión arterial de CO <sub>2</sub> )	< 45 mmHg	< 45 mmHg	> 45 mmHg	
SpO <sub>2</sub> (Saturación arterial de oxígeno), sin O <sub>2</sub> suplementario	> 95 %	91 – 95 %	< 90 %	

### 2.1.3 Epidemiología

El asma se reconoce como una de las enfermedades respiratorias crónicas más frecuentes en todo el mundo<sup>67</sup>. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), en la última década han aumentado en un 40 % tanto su prevalencia como las hospitalizaciones<sup>63</sup>.

Su prevalencia muestra una amplia variedad en los diferentes países, sin embargo, los datos muestran que el número de casos ha aumentado paulatinamente, la OMS estima aproximadamente 300 millones de asmáticos en el mundo, por lo que se considera un importante problema de salud pública en muchos de los países con mayores recursos<sup>4, 67</sup>. Existe suficiente evidencia mundial para afirmar que la prevalencia, incidencia, mortalidad y costos relacionados con el asma están aumentando (Ver Figura 1 y 2)<sup>63</sup>.

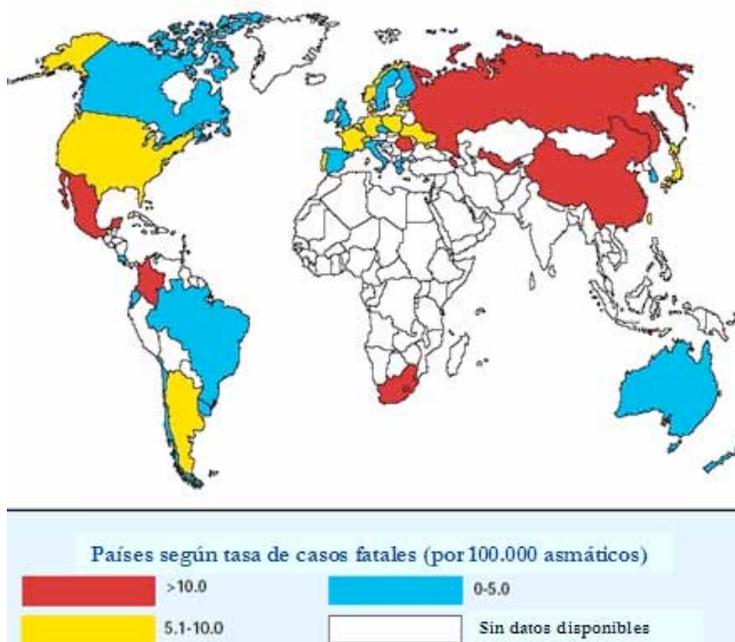


Figura 1 Mortalidad del asma<sup>43</sup>

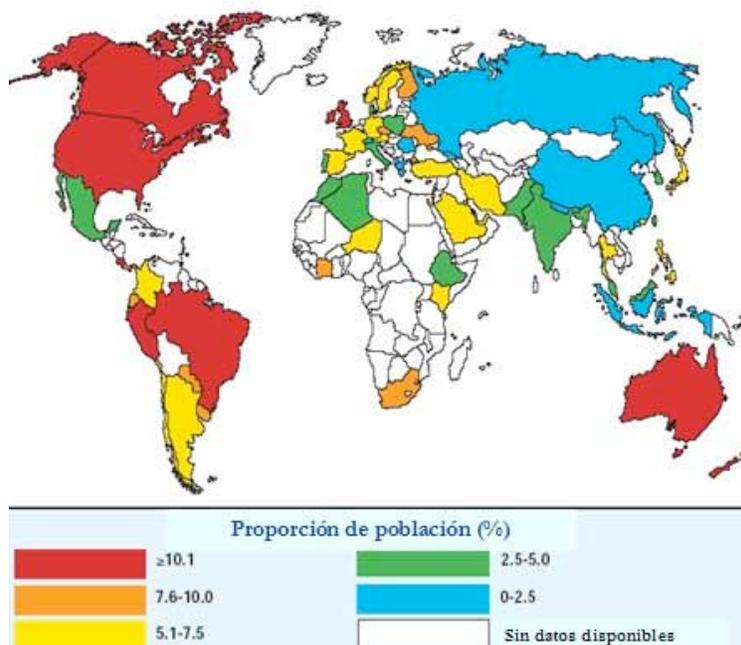


Figura 2 Prevalencia del asma <sup>43</sup>

El asma es una enfermedad que ocurre en cualquier región del mundo y en cualquier nivel socioeconómico, cuya prevalencia es mayor en niños que en adultos, se da con mayor frecuencia en niños que en niñas y con menor frecuencia en hombres que en mujeres <sup>63</sup>.

Según el Informe sobre la Salud del Mundo que dio la OMS en el 2002, el asma fue causa de 15, 010, 000 de AVAD (años de vida ajustados en función de la discapacidad en el mundo) y causó 226, 000 muertes <sup>63</sup>.

Para el tratamiento del asma se destinan más de 6, 000 millones de USD., de ellos, sólo 1 millón de USD es para medicamentos y más de 3, 000 millones de USD son para la atención de casos de asma grave (10 % de los asmáticos) <sup>63</sup>.

El estudio de mayor impacto epidemiológico aplicado en los países de los diversos continentes y con una gran población encuestada es el Estudio Internacional de Asma y Alergias en la Infancia (ISAAC) <sup>4, 28</sup>.

En la primera etapa, ISAAC exploró la prevalencia de los síntomas del asma en dos grupos de población: niños de 6 y 7 años, y niños de 13 y 14 años de edad; los resultados muestran que la prevalencia es muy variable de un país a otro, así puede ser tan baja como en los países escandinavos y China, en donde es inferior al 2 %, en contraste con la alta prevalencia observada en Inglaterra, Irlanda, Australia y Nueva Zelanda, en donde se aproxima al 30 %<sup>28, 67</sup>.

En México se aplicó en la Ciudad de Cuernavaca, reportándose una prevalencia de 6.6 % en la presencia de sibilancias; en Hermosillo, Sonora, se reportó una prevalencia del 9 % y en Monterrey, Nuevo León, se reportó una prevalencia del 11.2 % de enfermedades alérgicas y el 23 % de asma en esta población<sup>28, 67</sup>.

En México no se dispone de cifras exactas, sin embargo se calcula una población de entre 5 y 10 millones de asmáticos. En el año de 1999, en México, el asma fue la causa de 9, 432 egresos hospitalarios; 8, 068 en menores de 45 años; 1, 364 en mayores de esa edad y en el mismo año se reportaron 36 muertes de las cuales 24 fueron en mayores de 45 años<sup>63</sup>.

En el INER, estos datos son consistentes, ya que a pesar del importante número de asmáticos atendidos en hospitalización y en urgencias, las defunciones atribuibles directamente al asma son muy ocasionales; incluso no se encuentra dentro de las diez principales causas de defunción en los últimos años. Sin embargo, las cifras muestran un incremento paulatino, hasta llegar a ubicarse el asma como la primera causa de atención hospitalaria en el servicio de urgencias y en área de consulta externa (Ver Figura 3)<sup>67</sup>.

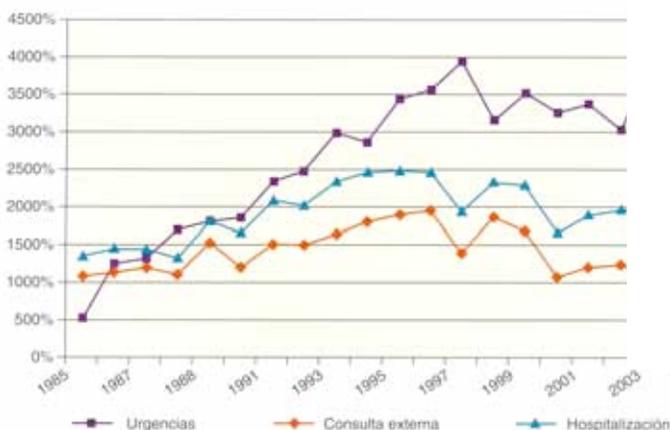


Figura 3 Morbilidad del asma en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) <sup>67</sup>

En términos generales, se puede resumir que si bien es reconocible que los casos nuevos de asma se han incrementado de manera importante con el paso de los años, es probable que la cifra real aún pueda ser mayor, tomando en cuenta el hecho de que la enfermedad con mucha frecuencia es subdiagnosticada; por otra parte, el diagnóstico erróneo se asocia a un tratamiento inadecuado, lo que sitúa a los pacientes en mayores riesgos de formas severas de la enfermedad, de complicaciones y potencialmente de aumento en la mortalidad <sup>67</sup>.

#### 2.1.4 Contaminación y factores predisponentes en el asma

La exposición a la contaminación atmosférica, tanto intramuros como extramuros, se asocia a una mayor incidencia de asma y de atopia, debido a que los síntomas se exacerban mientras mayor sea el grado de exposición a las diferentes sustancias presentes en el medio ambiente tales como partículas atmosféricas (PM: Material particulado), dióxido de sulfuro y óxidos de nitrógeno <sup>9, 80</sup>.

En el hogar, los contaminantes más comunes (contaminación intramuros), además de los alérgenos, son el polvo, los mohos, el humo del cigarro y las sustancias que provienen de la combustión de derivados del petróleo. Éstos que se utilizan para preparar los alimentos y para la calefacción, producen elementos químicos

irritantes y oxidantes como el óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>), monóxido de carbono (CO<sup>\*</sup>), compuestos orgánicos volátiles y formaldehídos. Otros contaminantes que por lo general pasan desapercibidos son los materiales para la limpieza, aerosoles, insecticidas, solventes, pinturas y perfumes <sup>9, 80</sup>.

En lugares en que existe un alto nivel de contaminación extramuros, como son las grandes ciudades, la época de quema de terrenos agrícolas, sitios con industrias que no controlan sus emisiones, etc., se recomienda que en los días de alta contaminación los pacientes con asma eviten las actividades físicas y la permanencia al aire libre <sup>9</sup>.

Los factores genéticos, el género, los factores étnicos, los factores ambientales, la contaminación del aire, la dieta, el tabaquismo, la ocupación, los factores socio – económicos, las infecciones respiratorias y la atopia, son los factores predisponentes más importantes y que agravan la severidad del asma <sup>63</sup> (Ver Figura 4) <sup>18</sup>.

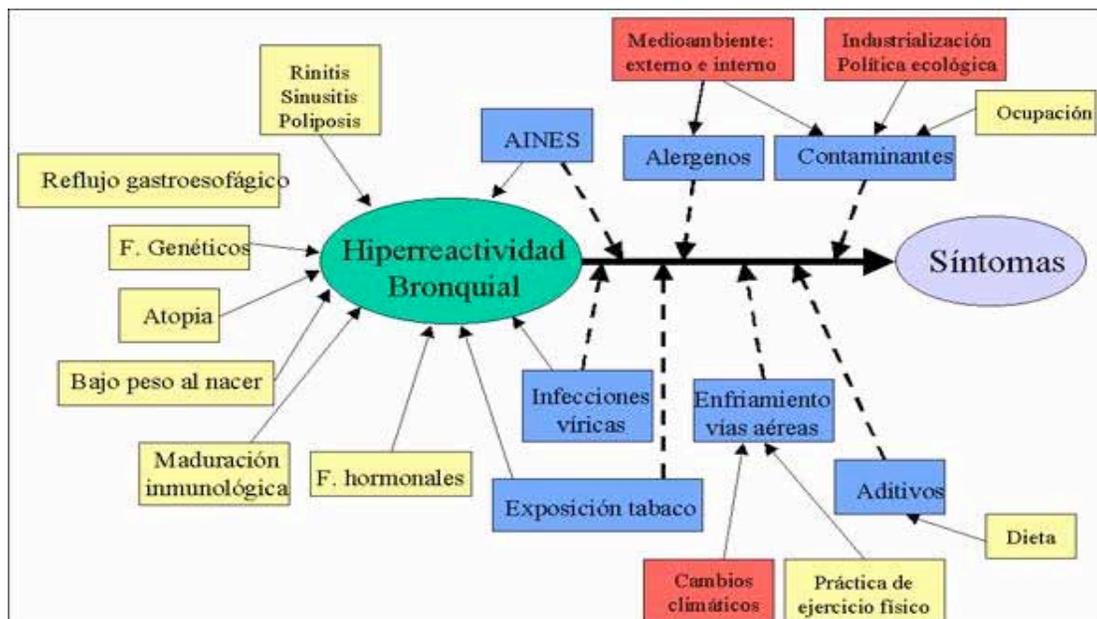


Figura 4 Factores predisponentes en el asma <sup>18</sup>

La herencia es el factor predisponente más relevante para el desencadenamiento del proceso inflamatorio que lleva a la enfermedad. Cuando este factor además se asocia a la exposición de agresores del aparato respiratorio (polvos, humos) entonces las condiciones se dan para que las células inflamatorias interactúen a través de sus mediadores químicos y una vez que el epitelio bronquial es expuesto a antígenos y a estímulos no inmunológicos se promueve la inflamación crónica y en muchos casos con cambios irreversibles (remodelación) que condicionarán las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Ver Figura 5) <sup>16</sup>.

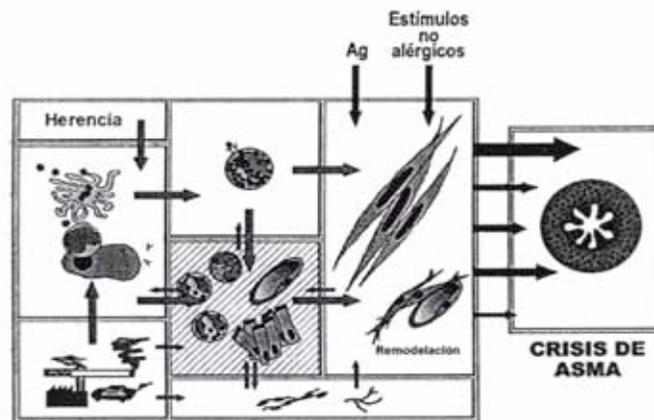


Figura 5 La herencia como factor predisponente <sup>16</sup>

### 2.1.5 Patogénesis del asma

Los pacientes con asma experimentan crisis de broncoconstricción con aumento de la producción de un moco espeso que provoca obstrucción bronquial y agrava la dificultad respiratoria<sup>1</sup>. Estos pacientes presentan dos fases: La fase temprana de la respuesta bronquial al antígeno inhalado, la cual involucra a los mediadores de los mastocitos, y la fase inflamatoria tardía que involucra a los eosinófilos; ambas fases son dependientes de IgE <sup>65</sup>.

La IgE se produce como respuesta inmunológica a alérgenos en individuos atópicos. Esta proteína se fija a la membrana de las células inflamatorias (células cebadas, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, monocitos, basófilos y plaquetas) por medio de receptores específicos <sup>67</sup>.

Al contactar con un antígeno inhalado inmediatamente se produce la liberación de diversos mediadores químicos, los cuales favorecen la contracción del músculo liso o bien promueven o sostienen la inflamación <sup>67</sup>.

Desde hace varias décadas, a través de las necropsias, se conoció la relevante participación de la inflamación de las vías aéreas de los pacientes fallecidos por un estado asmático, pero hasta hace 25 años, se demostró que en el epitelio bronquial de pacientes asmáticos controlados, asintomáticos y con uso ocasional de medicamentos, se presenta un desarreglo de la arquitectura del epitelio bronquial (remodelación), angiogénesis y una muy importante infiltración de células inflamatorias de la mucosa de las vías aéreas <sup>67, 80</sup>.

Actualmente, se sabe que en la patogénesis se interrelacionan diferentes componentes anatómicos, celulares, inflamatorios, de remodelación, neurológicos y bioquímicos, y que todos ellos deben ser abordados en conjunto para explicar los cambios en la enfermedad <sup>67, 80</sup> (Ver Figura 6 y 7) <sup>1, 65</sup>.

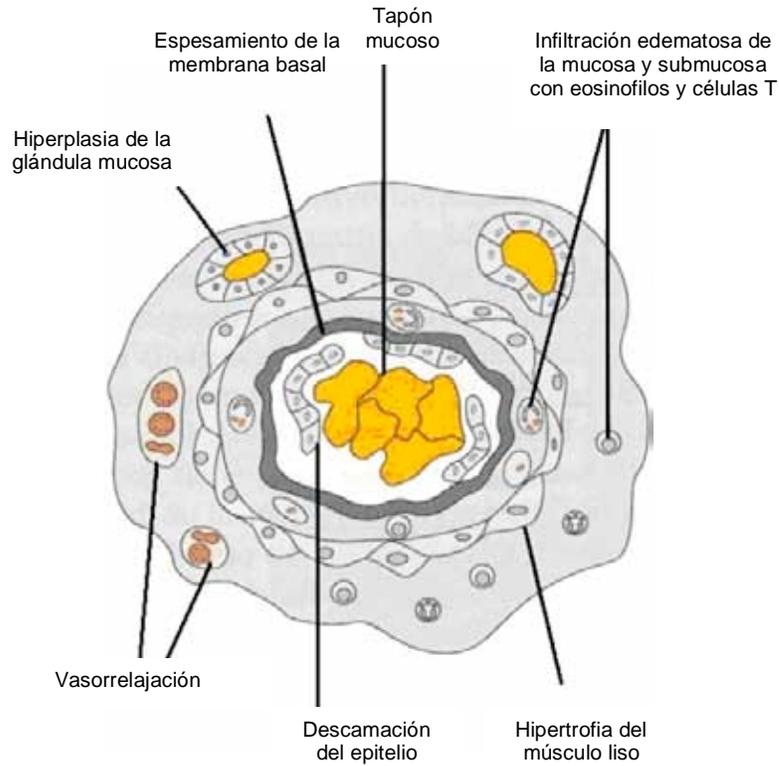


Figura 6 Cambios patológicos en el asma. Diagrama de un corte de una vía aérea en el asma severa <sup>65</sup>



Figura 7 Características histopatológicas del asma bronquial <sup>1</sup>

### **2.1.5.1 Músculo liso bronquial**

La excesiva contracción del músculo liso bronquial siempre ha sido considerado uno de los mecanismos más importantes del asma <sup>67</sup>. Esta respuesta de contracción exagerada puede estar condicionada por varios factores: Liberación iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por el inositol 1, 4, 5–trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), intervención de la enzima proteína cinasa C (PKC) y sus múltiples isoformas en la contracción mantenida del músculo liso bronquial *in vitro*, y puede por tanto ser de particular importancia en pacientes con asma crónica <sup>59</sup>. Por otra parte, también se presentan cambios morfológicos derivados de factores de crecimiento producidos en enfermedades respiratorias que originan incremento del engrosamiento del músculo liso bronquial, debido a hipertrofia (aumento del tamaño de las células) e hiperplasia (proliferación celular) <sup>67</sup>.

### **2.1.5.2 Epitelio bronquial**

La tráquea y los bronquios tienen cartílago en sus paredes, pero poco músculo liso. Están recubiertos por epitelio ciliado que contiene glándulas mucosas y serosas <sup>19</sup>, el cual actúa como un mecanismo de defensa del aparato respiratorio, ya que al no permitir el paso de alérgenos inhalados se disminuye la posibilidad de sensibilización en sujetos con factor de riesgo – por ejemplo, la atopia –; sin embargo, cuando el epitelio se lesiona, se incrementa la permeabilidad, no sólo favoreciendo a la sensibilización del paciente a los alérgenos, sino exponiendo a la superficie epitelial a los receptores de irritación, facilitando así a los reflejos vagales. Como consecuencia del proceso inflamatorio activo del asma, el epitelio se descama y estas células pueden ser observadas en el esputo de los pacientes en forma de conglomerados, llamados cuerpos de Creola. Esta denudación del epitelio es un factor adicional que favorece el aumento en la permeabilidad <sup>67</sup>.

### 2.1.5.3 Mecanismos neurales

Las paredes de los bronquios y bronquiolos están innervadas por el sistema nervioso autónomo existiendo abundantes receptores  $\beta_2$  adrenérgicos en el epitelio y músculo liso bronquiales. El sistema nervioso adrenérgico posee terminaciones  $\alpha$  y  $\beta$ . Los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos intervienen en la activación de la broncodilatación, incrementan la secreción bronquial y favorecen un adecuado transporte mucociliar, mientras que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos la inhiben <sup>19</sup>.

Por otra parte, las vías aéreas también poseen innervaciones colinérgicas, las cuales son las principales responsables de la respuesta broncoconstrictora en las vías aéreas del humano <sup>59</sup>. El sistema nervioso vagal colinérgico inerva el músculo liso traqueobronquial, a través de la estimulación de los receptores muscarínicos por un neurotransmisor – la acetilcolina – produce contracción, secreción de moco por las glándulas y dilatación de los vasos sanguíneos; por lo tanto, los nervios colinérgicos representan una de las principales vías broncoconstrictoras en el árbol traqueobronquial del humano <sup>67</sup>. Los receptores muscarínicos  $M_2$  normalmente inhiben la liberación de acetilcolina (ACh) en las vías aéreas del humano y se piensa que en asma estos receptores pueden ser disfuncionales <sup>59</sup>.

Existe otro sistema con características diferentes a los citados anteriormente, denominado sistema no adrenérgico no colinérgico (NANC), el cual controla la contracción del músculo liso bronquial [NANC excitatorio (eNANC) e inhibitorio o de relajación (iNANC)] <sup>64</sup>. El neurotransmisor broncodilatador en las vías aéreas ha sido identificado como el óxido nítrico ( $NO^*$ ). La liberación neural del  $NO^*$  modula la respuesta neural colinérgica en las vías aéreas humanas *in vitro*, aparentemente a través de un antagonismo funcional con la acetilcolina liberada <sup>84</sup>.

### 2.1.5.4 Células inflamatorias

La interrelación que existe entre las células es compleja. La activación y el efecto es producido por cada una de ellas a través de una amplia gama de mediadores, tales como: Histamina, heparina, proteasas, factor quimiotáctico para eosinófilos (ECF) y factor activador de plaquetas (PAF), cuyos principales efectos son la vasodilatación, aumento de la permeabilidad y contracción del músculo liso <sup>58</sup> (Ver Figura 8) <sup>81</sup>.

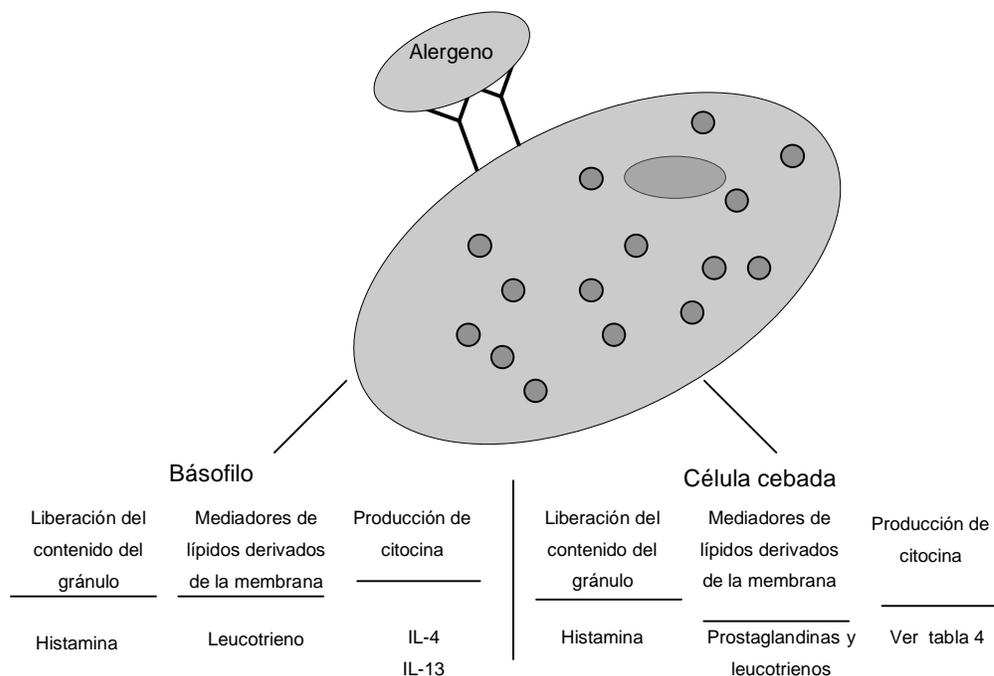


Figura 8 Mediadores de la inflamación <sup>81</sup>

### 2.1.5.5 Células cebadas

Las células cebadas o mastocitos se encuentran distribuidas, tanto en las vías aéreas como en el parénquima pulmonar. Existen dos tipos bien diferenciados de estas células: Las del tipo mucoso y las del tipo conectivo. En los pacientes asmáticos, las células cebadas de tipo mucoso son las predominantes <sup>68</sup>.

Las células cebadas de asmáticos muestran características diferentes de las de los sujetos sanos: Incremento en el número y mayor facilidad para ser estimuladas y, por tanto, degranuladas <sup>68</sup>.

Cuando el estímulo se realiza a través de la interacción de un antígeno con las IgE de su superficie, entonces, el mecanismo es de tipo inmunológico; de la misma manera, puede ser estimulada no inmunológicamente a través de mediadores de estimulación directa, por ejemplo, el factor liberador de histamina y la acetilcolina<sup>69</sup>.

La célula cebada actúa como un importante reservorio de mediadores químicos preformados, pero a la vez con la capacidad de síntesis *de novo* de otros más; y por otra parte, posee un gran potencial de degranulación; son las primeras células en activarse y desencadenar la respuesta asmática temprana, e influyen de manera directa en el inicio y mantenimiento de la respuesta asmática tardía a través de la liberación de factores quimiotácticos de otras células inflamatorias <sup>68</sup>. (Ver Tabla 4 y 5) <sup>81</sup>.

Tabla 4 Mediadores del proceso inflamatorio provenientes de células cebadas <sup>81</sup>

Clases	Mediador	Efectos
Preformados	Histamina	Vasodilatación, permeabilidad vascular, prurito, tos, broncoconstricción, rinorrea.
	Proteasas	Vasodilatación, permeabilidad vascular, broncoconstricción.
	Heparina	
Derivados de lípidos	LTC <sub>4</sub>	Broncoconstricción, vasodilatación, permeabilidad vascular.
	LTB <sub>4</sub>	Quimiotaxia de leucocitos.
	PGD <sub>2</sub>	Vasodilatación, permeabilidad vascular, broncoconstricción, secreción de moco.
	PAF	Broncoconstricción, quimiotaxia de leucocitos.
LT = Leucotrieno; PG = Prostaglandina; PAF = Factor activador de plaquetas		

Tabla 5 Células reclutadas durante la inflamación <sup>81</sup>

Células	Mediadores	Efectos
Eosinófilo	Proteína básica mayor, ECP, EDNT, LTC <sub>4</sub> , IL – 1, IL – 6, GM – CSF, superóxido.	Exfoliación epitelial, broncoconstricción, estimulación de la inflamación.
Linfocito T	Diversas citocinas.	Estimulación de la inflamación.
Basófilo	Histamina, LTC <sub>4</sub> , IL – 4.	Broncoconstricción.
Macrófago	TNF – $\alpha$ , superóxido proteasas, LTB <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> .	Daño tisular, quimiotaxia, broncoconstricción, secreción de moco.

ECP = Proteína catiónica eosinófila; EDNT = Neurotoxina derivada de eosinófilos; LT = Leucotrieno; IL = Interleucina; GM – CSF = Factor estimulante de colonias de granulocitos / macrófagos; TNF = Factor de necrosis tumoral; PG = Prostaglandina.

## 2.2 Estrés oxidativo

El asma es un padecimiento inflamatorio crónico de las vías respiratorias. Uno de sus componentes es la generación y participación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERON), que constituye en la actualidad un motivo de preocupación debido a que estos radicales libres son generados durante el proceso asmático por diferentes células del aparato respiratorio, por leucocitos y plaquetas, ocasionando gran parte de los daños estructurales y funcionales los cuales contribuyen a la condición de estrés oxidativo asociado al asma <sup>35, 73</sup>.

La generación de ERO y ERON forma parte del proceso inflamatorio contribuyendo a las alteraciones que se presentan durante el asma, aunque la generación de estos radicales también puede llevarse en forma independiente del proceso inflamatorio, dado que forman parte de respuestas fisiológicas autorregulatorias del organismo <sup>35</sup>.

El concepto especies reactivas de oxígeno (ERO) incluye a los radicales libres de este elemento y a ciertos agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales (por ejemplo, HOCl, HOBr, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En otras palabras, todos los radicales libres de oxígeno son ERO, pero no todas las ERO son radicales libres

de oxígeno, sin embargo todos se forman por la reducción incompleta del oxígeno molecular <sup>57</sup>.

Las ERO (peróxido de hidrógeno;  $H_2O_2$ , anión superóxido;  $O_2^{\bullet-}$  y el radical hidroxilo;  $HO^{\bullet}$ ) y las ERON (óxido nítrico;  $NO^{\bullet}$  y peroxinitrito;  $ONOO^-$ ) contribuyen a los cambios inflamatorios en las vías respiratorias de los pacientes asmáticos <sup>2</sup>.

En apoyo a esta observación se ha demostrado que los niveles altos de las ERO inducen modificaciones estructurales por oxidación en las proteínas de las vías aéreas de los asmáticos <sup>2</sup>.

Casi todos los padecimientos pulmonares están relacionados con procesos inflamatorios, presentando niveles tóxicos de ERO y ERON <sup>2</sup>. En condiciones fisiológicas, la mitocondria es la fuente más importante de la generación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Otra fuente para la generación de este radical se realiza como parte del estallido respiratorio de los leucocitos a través de la activación de la enzima membranal NADPH oxidasa; en este caso, el radical representa un potente agente microbicida generado por neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos <sup>35</sup>.

La mayor parte del  $O_2^{\bullet-}$  generado *in vivo* es dismutado lentamente en un proceso no enzimático o rápidamente en un proceso catalizado por las enzimas superóxido dismutasas (SOD) dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El peróxido de hidrógeno también puede ser generado por la xantina oxidasa o por la amino oxidasa. Una vez formado el  $H_2O_2$ , su capacidad oxidante puede ser amplificada por la peroxidasa de los eosinófilos (EPO) y la mieloperoxidasa (MPO) de los neutrófilos (Ver Figura 9) <sup>35</sup>.

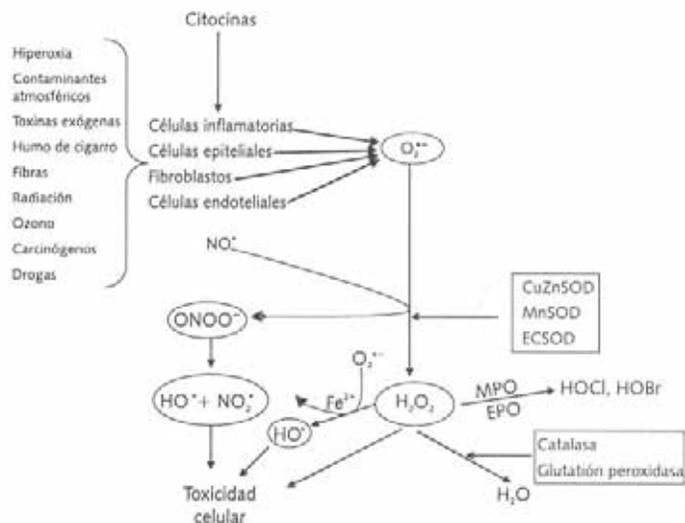


Figura 9 Eventos oxidativos y nitrosantes en el asma <sup>35</sup>

Cuando la generación de especies reactivas supera a los mecanismos antioxidantes de regulación, se presenta el estado metabólico de *estrés oxidante*, el cual se define como el desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes a favor de un daño potencial <sup>29, 35</sup>.

### 2.3 Óxido nítrico

Los monóxidos de nitrógeno pueden existir en tres formas, según el estado de oxidorreducción del nitrógeno: el *cation nitrosonio* ( $NO^+$ ), el *óxido nítrico* ( $NO^{\bullet}$ ) y el *anión nitroxilo* ( $NO^-$ ) <sup>29</sup>.

El óxido nítrico posee un electrón no apareado en su estructura molecular (en un orbital molecular  $\pi$ ), por lo que no se considera un radical libre <sup>29</sup>. A temperatura ambiente, el  $NO^{\bullet}$  es un gas y su solubilidad en el medio acuoso es similar a la del oxígeno, pero ésta se incrementa de 6 a 8 veces en medios y disolventes no polares, lo que le permite difundir con gran facilidad a través de membranas biológicas <sup>29</sup>. Además, es una de las moléculas más pequeñas, simples, ubicuas y

con actividad biológica que existen en la naturaleza <sup>29</sup>. El óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) no sólo es uno de los factores más importantes que regulan el tono de los vasos sanguíneos, sino que también participa a manera de segundo mensajero en múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos <sup>29</sup>. El NO<sup>•</sup> ejerce sus efectos directamente uniéndose al grupo hemo<sup>83</sup>, por ejemplo al de la enzima Guanilil ciclasa soluble para activarla y sintetizar el nucleótido cíclico GMPc <sup>29</sup>.

Adicionalmente y de manera indirecta, el NO<sup>•</sup> tiene otros efectos cuando reacciona con otras moléculas, tales como el oxígeno (O<sub>2</sub>), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), y grupos sulfhidrilos (SH), formando trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y S-nitrosotioles (RSNO), respectivamente <sup>29</sup>.

### 2.3.1 Biosíntesis

La biosíntesis del óxido nítrico es catalizada por la enzima *óxido nítrico sintasa* (NOS, *nitric oxide synthase*), cuyo nombre sistemático es L-arginina, NADPH: Oxígeno oxidoreductasa (formadora de óxido nítrico), la cual utiliza L-arginina, NADPH y oxígeno como cosustratos y FAD (flavín adenín dinucleótido oxidado), FMN (flavín mononucleótido), grupo hemo y tetrahidrobiopterina (6-R-tetrahidrobiopterina, H<sub>4</sub>B) como cofactores, y sus productos: La citrulina, el óxido nítrico y agua. El nitrógeno del óxido nítrico proviene del grupo guanidino de la L-arginina <sup>29</sup>.

El mecanismo de reacción aceptado involucra dos reacciones secuenciales del tipo de las monooxigenasas: En la primera, uno de los átomos de oxígeno molecular está presente en el intermediario N-hidroxi-L-arginina y el otro en el agua; mientras que en la segunda reacción, los átomos de otra molécula de oxígeno se distribuyen uno en la citrulina resultante y otro en la segunda molécula de agua (Ver Figura 10) <sup>29</sup>.

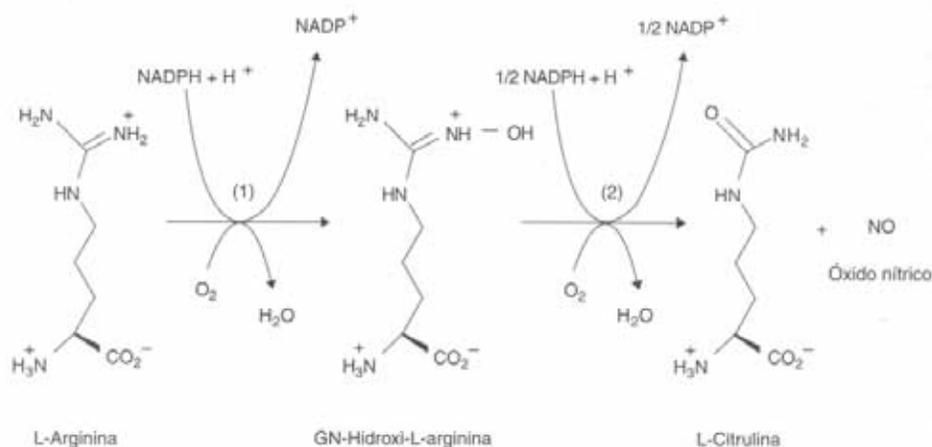


Figura 10 Reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa. Se realiza en 2 etapas: 1) Uno de los átomos del oxígeno molecular se queda en el intermediario N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina y el otro en la molécula del agua; 2) un átomo de otra molécula de oxígeno queda en el producto L-citrulina y el otro en la segunda molécula de agua. El NO<sup>\*</sup> proviene del grupo hidroxilamino del intermediario N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina <sup>29</sup>

## 2.4 Grupos sulfhidrilos

Todas las células tienen un tiol llamado *glutación* el cual protege a las células de oxidantes dañinos; los análogos de azufre de los alcoholes (ROH) son los tioles (RSH). La nomenclatura substitutiva de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) de los tioles se hace agregando el sufijo *-tiol* al nombre del alcano correspondiente, numerando la cadena en la dirección que da el localizador menor al carbono que lleva el grupo -SH. Como con los dioles, se conserva la -o final del nombre del alcano. Cuando el grupo -SH se nombra como un sustituyente, se llama grupo *mercapto*. También se conoce con frecuencia como grupo *sulfhidrilo*, pero éste es un término genérico que no se usa en la nomenclatura sistemática <sup>7</sup>.

El enlace S-H es menos polar que el enlace O-H, la polaridad menor del enlace S-H, en especial la disminución del carácter positivo del protón causa que estén ausentes los puentes de hidrógeno en los tioles <sup>7</sup>.

A pesar que los enlaces S–H son menos polares que los enlaces O–H, los tioles son más ácidos que los alcoholes. Esto se debe en gran medida a que los enlaces S–H son más débiles que los enlaces O–H <sup>7</sup>.

La oxidación más importante es la conversión de *tioles* a *disulfuros*. Aunque se dispone de una variedad de agentes oxidantes para esta transformación, ocurre con tanta facilidad que los tioles se convierten lentamente en disulfuros por el oxígeno en el aire. Los ditiolos forman disulfuros cíclicos por formación de un enlace intramolecular azufre–azufre. Los enlaces S–S en los disulfuros son intermediarios en fuerza entre los enlaces covalentes típicos e interacciones más débiles como los puentes de hidrógeno. Por tanto, los enlaces S–S proporcionan más estabilidad estructural que un puente de hidrógeno, pero pueden romperse mientras dejan intacta la estructura covalente <sup>7</sup>.

Las formas tridimensionales de muchas proteínas están regidas y son estabilizadas por enlaces S–S que conectan lo que ordinariamente serían segmentos remotos de la molécula <sup>7</sup>.

#### **2.4.1 Estructura y biosíntesis del glutatión (GSH)**

El  $\gamma$ -glutamil–cisteinil–glicina, también llamado glutatión (GSH), es un tripéptido el cual se sintetiza mediante el ciclo del  $\gamma$ -glutamilo del metabolismo del glutatión y esta síntesis es dependiente de la disponibilidad de cisteína en el medio. Su síntesis se realiza en dos pasos, catalizados por reacciones ATP–dependientes (Ver Figura 11 y 12) <sup>47, 48, 79, 83</sup>.

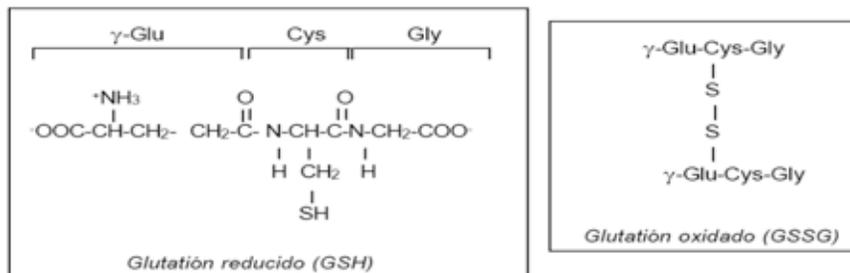


Figura 11 Estructura del glutathión reducido (GSH) y del glutathión oxidado (GSSG) <sup>83</sup>

El primer paso consiste en una condensación del grupo  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutámico con el grupo  $\alpha$ -amino de la cisteína. El grupo carboxilo es activado en un principio por el ATP (adenosín trifosfato) para dar lugar a un intermediario del tipo fosfato de acilo, que a continuación es atacado por el grupo amino de la cisteína (Ver Figura 12 y Reacción 1) <sup>49, 50, 51, 83</sup>.



En el segundo paso es activado el grupo  $\alpha$ -carboxilo a la cisteína a una forma de fosfato de acilo que permite la condensación con la glicina (Ver Figura 12 y Reacción 2) <sup>49, 50, 51, 83</sup>.



Las reacciones del ciclo están catalizadas por: (1)  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa, (2) glutathión sintetasa, (3)  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa, (4)  $\gamma$ -glutamyl ciclotransferasa, (5) 5-oxoprolinasa y (6) una proteasa intracelular (Ver Figura 12) <sup>83</sup>.

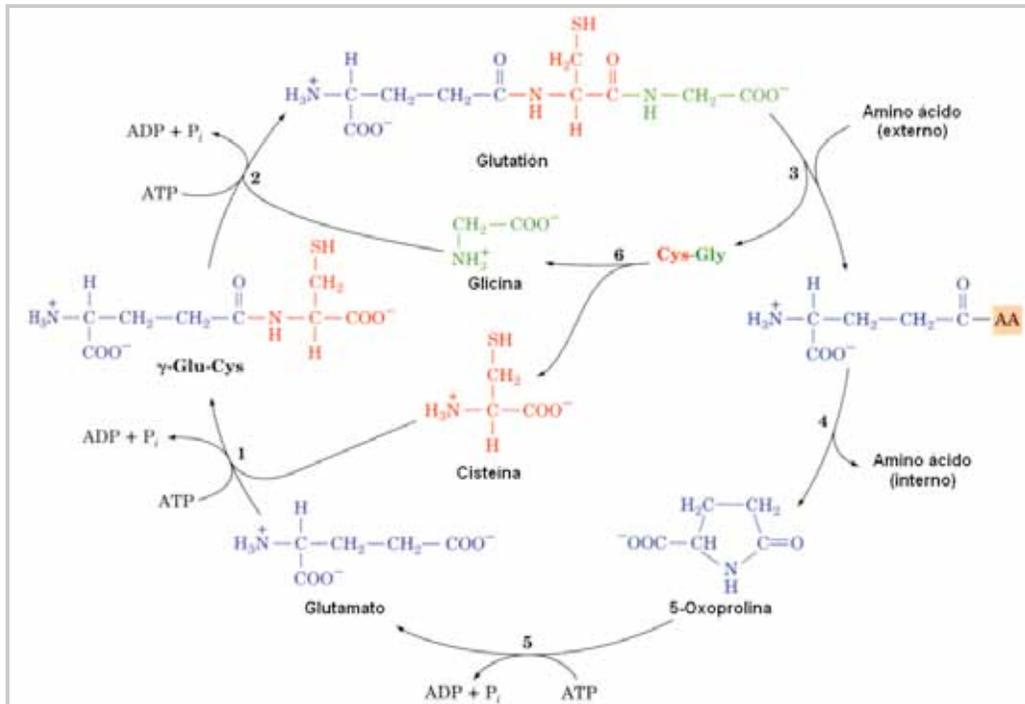


Figura 12 Síntesis del glutatión como parte del ciclo del  $\gamma$ -glutamilo del metabolismo del glutatión<sup>83</sup>

#### 2.4.2. Funciones del GSH en la célula

El GSH es el mayor componente sulfhidrilo no proteico en las células de mamíferos, presente a concentraciones de 0.5–10 mmol/L. Es un tiol libre intracelular que tiene importantes funciones biológicas como son: Durante la proliferación celular, transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas y ADN (ácido desoxirribonucléico), reducción de disulfuros y otros grupos químicos, protección celular contra la oxidación y como reserva de cisteína<sup>49, 50, 51, 52</sup>.

El GSH celular juega un papel clave en dichos procesos biológicos, pero, notablemente, en la protección de las células contra la oxidación, ya que el grupo sulfhidrilo (SH) es un fuerte nucleófilo, y confiere protección contra el daño causado por oxidantes, neutrófilos y radicales libres<sup>52</sup>.

### 2.4.3 Acción redox del GSH (función antioxidante)

El GSH presente en elevadas concentraciones (~5 mM) en las células animales, actúa como amortiguador de los grupos sulfhidrilo. Pasa cíclicamente de una forma de tiol reducido (GSH) a una forma oxidada (GSSG), en la cual los dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro. Esta reacción está catalizada por la glutatión peroxidasa (GSH-Px), una enzima que tiene la peculiaridad de contener un átomo de selenio (Se) unido covalentemente en forma de seleno-cisteína, que resulta esencial para la actividad enzimática (Ver Figura 13) <sup>83</sup>.

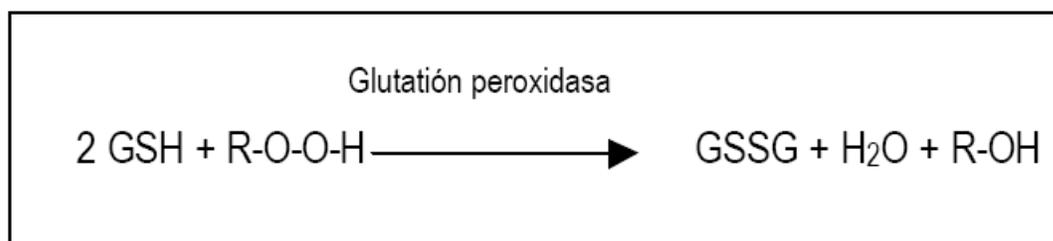
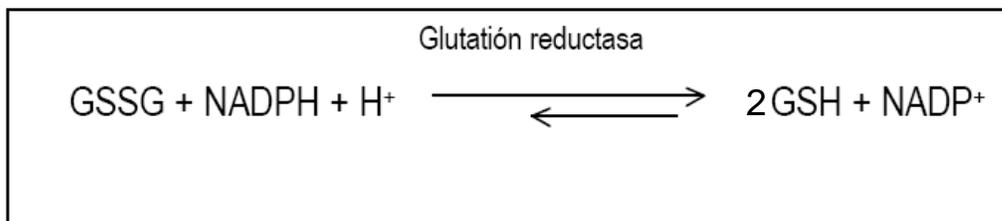


Figura 13 Oxidación del GSH <sup>83</sup>

El GSH puede considerarse como una especie de amortiguador redox, el cual ayuda a mantener a los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en forma de ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), a la vez que actúa como un agente reductor para la glutarredoxina. Su acción redox puede utilizarse también para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones anaeróbicas <sup>52</sup>.

El GSSG es reducido de nuevo a GSH por una glutatión reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH (nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido) como donador de electrones (Ver Figura 14) <sup>52</sup>.

Figura 14 Reducción del GSSG <sup>83</sup>

El GSH es un antioxidante intracelular crítico, debido a su relativa abundancia y capacidad para ciclar rápidamente entre la forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG). Típicamente, la mayoría (> 90 %) del total del glutatión intracelular (GSH + GSSG) se encuentra como GSH. El balance entre GSH y GSSG se mantiene a través de un rápido reciclaje del GSSG a GSH vía GSSG reductasa <sup>83</sup>.

Durante períodos de estrés oxidativo, el GSH elimina el exceso de radicales libres intracelulares y, por oxidación del grupo tiol de su residuo de cisteína, se oxida a GSSG mediante la acción de la GSH-Px (glutatión peroxidasa), que posteriormente se vuelve a convertir a GSH vía GSSG reductasa <sup>29</sup>.

#### 2.4.4 Vías metabólicas del GSH en las células

El GSH y sus conjugados se degradan extracelularmente en un proceso de dos etapas, la primera de las cuales es catalizada por la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) y transfiere el grupo  $\gamma$ -glutamil a un aceptor apropiado <sup>40, 83</sup>.

El GSH es la mayor fuente de equivalentes reductores intracelulares no proteicos para muchos procesos biosintéticos y también es un conjugante para el metabolismo de los eicosanoides (hepoxilinas, leucotrienos y prostaglandinas) y muchos carcinógenos y toxinas <sup>40, 83</sup>.

El riñón y el hígado secretan grandes cantidades de GSH, el cual se divide en sus aminoácidos constituyentes mediante la acción secuencial de la GGT y una dipeptidasa, siendo entonces reabsorbidos y usados en muchas reacciones intracelulares que incluyen la resíntesis de GSH <sup>40</sup>.

En la secreción renal, el GSH sintetizado intracelularmente a partir de la cisteína, se transporta al interior del túbulo renal y se oxida a GSSG, rompiéndose posteriormente por la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa y la dipeptidasa, liberando cistina dentro del túbulo <sup>27</sup>.

La enzima unida a la membrana, la GGT, está posiblemente implicada en la síntesis de GSH a través de su función en la captación de aminoácidos. Se cree que esta enzima transfiere el grupo  $\gamma$ -glutamyl del GSH extracelular a un aminoácido extracelular; entonces, el aminoácido  $\gamma$ -glutamyl es transportado al interior de la célula. La actividad de la enzima debe ser un factor tasa limitante en el transporte de un número de aminoácidos, incluyendo la cisteína y en el mantenimiento de los niveles celulares de GSH <sup>52</sup>.

El GSH previene la apoptosis y mantiene la viabilidad celular; las células privadas de GSH son más propensas a sufrir estrés oxidativo, porque su equilibrio redox está alterado y se ve perjudicada su capacidad para eliminar o detoxificar los diversos agentes ERO intermediarios que se forman en el metabolismo celular normal <sup>23</sup>.

Algunas células, mayoritariamente los hepatocitos, pueden liberar GSH reducido a través de transportadores específicos, manteniendo un nivel constante de GSH en la corriente sanguínea <sup>3</sup>.

Las diferencias fisiológicas en el transporte de GSH en los dos polos de los hepatocitos sugirieron la existencia de dos sistemas distintos de transporte, posiblemente codificados por genes diferentes <sup>3</sup>.

### 2.4.5 S–nitrosación como proceso de regulación

La reacción reversible de S–nitrosación por derivados del NO<sup>\*</sup>, se ha considerado un posible mecanismo de control de la actividad biológica de diversas proteínas; muchas de ellas, como enzimas, canales iónicos y factores de transcripción, pueden ser modificadas *in vitro* mediante S–nitrosación en sus residuos de cisteínas. Aunque se desconoce si tal reacción constituye un mecanismo para regular la actividad biológica de proteínas *in vivo*, existen evidencias que apoyan esta hipótesis<sup>20, 29</sup>.

Algunos ejemplos de la modificación de proteínas por S–nitrosación son: Inhibición reversible de la gliceraldehído 3–fosfato deshidrogenasa, inhibición de la actividad de la caspasa–3 y de la apoptosis, activación del canal de potasio dependiente de calcio (K<sub>Ca</sub>) en músculo liso y del canal liberador de calcio cardiaco (CRC), y la activación de la proteína<sup>20</sup> p21<sup>ras</sup>.

En el pulmón el S–nitrosoglutatión (GSNO) juega un papel importante en la fisiología de este órgano y existen evidencias importantes de que su concentración se encuentra disminuida en las vías aéreas de pacientes con asma, probablemente por una elevada actividad de la enzima S–nitrosoglutatión reductasa (GSNOR); hecho que se ha vinculado con los episodios de bronco constricción que se presenta en el asma<sup>60, 64</sup>.

La albúmina de suero de bovino (BSA), aunque posee sólo un grupo sulfhidrilo, constituye la fuente más abundante de tioles en el plasma sanguíneo, ya que su concentración en este fluido es de ~0.5 mM. Su nitrosotiol correspondiente (BSA–SNO) tiene una vida media de ~24 horas en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.6 y a pesar de que la concentración de NO<sup>\*</sup> en el plasma sanguíneo es de ~4 nM, la de BSA–NO es de ~5 μM, lo que representa alrededor de 80% de todos los nitrosotioles plasmáticos<sup>29</sup>.

El hecho de que la administración de inhibidores de las óxido nítrico sintasas reduzca la concentración de nitrosotioles plasmáticos en animales de experimentación, apoya la hipótesis de que estos aductos son sintetizados *in vivo* a partir del NO<sup>•</sup> formado enzimáticamente<sup>32</sup>. Además, el suministro de BSA-SNO a animales de experimentación, produce efectos similares a los del NO<sup>•</sup>, por ejemplo, inhibe la agregación plaquetaria, la vasorrelajación y disminuye la presión arterial, hechos que sugieren la existencia de un significado fisiológico para la BSA-SNO<sup>29</sup>.

Otra proteína considerada como reservorio de NO<sup>•</sup> es la hemoglobina (Hb), la cual se encuentra en los eritrocitos, donde interviene en el intercambio y transporte de oxígeno, también es capaz de nitrosarse *in vitro* e *in vivo* en su cisteína 93 presente en sus dos subunidades  $\beta$  (cys- $\beta$ 93), formando el nitrosotiol correspondiente Hb-SNO<sup>83</sup>.

Resulta interesante que la Hb-SNO se encuentra en una concentración diez veces mayor en los eritrocitos de sangre arterial (~0.3  $\mu$ M) que en los de sangre venosa (~0.03  $\mu$ M); asimismo, la facilidad de liberación de NO<sup>•</sup> por parte del nitrosotiol de la desoxihemoglobina (Hb-SNO) es mayor que la del nitrosotiol de la oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>-SNO). Este hecho, aunado a otras evidencias experimentales, ha originado la hipótesis de que los nitrosotioles de hemoglobina tienen la función de aumentar la perfusión sanguínea en los tejidos con bajas concentraciones de oxígeno, mediante la liberación de NO<sup>•</sup> en esas regiones; otras proteínas son capaces de ser nitrosadas en grupos sulfhidrilos, sin embargo, estas modificaciones se han relacionado más con procesos de regulación que con una función de transporte o de reservorios de óxido nítrico<sup>83</sup>.

#### 2.4.6 Sistemas enzimáticos que liberan o destruyen el óxido nítrico del S-nitrosoglutatión

Los S-nitrosotioles (RSNO) son formados vía S-nitrosación (también llamada S-nitrosilación) de tioles (RSH), por el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) en condiciones aerobias, donde reaccionan con equivalentes nitrosos ( $\text{NO}^+$ ) o por medio de la reacción de transnitrosación entre un tiol (RSH) y un S-nitrosotiol (RSNO) preformado <sup>86</sup>.

Debido a que los S-nitrosotioles (RSNO) pueden liberar óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) y tienen un tiempo de vida media mucho mayor que el  $\text{NO}^\bullet$ , han sido propuestos como reservorios estables para el almacenamiento y transporte de óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), haciendo posible que este segundo mensajero actúe a distancia <sup>25, 82</sup>.

Adicionalmente, los RSNO se han implicado en las acciones biológicas complejas del  $\text{NO}^\bullet$ , por ejemplo, los nitrosotioles tanto proteicos como no proteicos (tales como S-nitrosoalbúmina S-nitrosoglutatión, respectivamente), tienen muchos de los efectos del  $\text{NO}^\bullet$ , tales como vías de señalización, neurotransmisión, respuesta inmune no específica, vasorrelajación e inhibición de la agregación plaquetaria <sup>82</sup>. Sin embargo, algunas de estas actividades no son dependientes de la liberación del  $\text{NO}^\bullet$ , pero sí de la S-nitrosación de proteínas específicas <sup>38, 88</sup>. De hecho, la S-nitrosación de proteínas se ha propuesto como una nueva modificación post-traducciona l de proteínas que regula la actividad de enzimas, proteínas estructurales y/o factores de transcripción <sup>34, 76</sup>.

Además de la liberación espontánea del  $\text{NO}^\bullet$  a partir de los S-nitrosotioles, los sistemas enzimáticos con actividades de liberación de  $\text{NO}^\bullet$  han sido propuestos desde principios de la década de los 90's <sup>38, 61</sup>.

Hoy en día, muchas enzimas con estas actividades han sido documentadas, incluyendo la tiorredoxina <sup>72, 78</sup>, la proteína disulfuro isomerasa (PDI) <sup>62, 87</sup> y la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) <sup>41</sup>.

La PDI es una proteína homodimérica ampliamente distribuida en los tejidos eucarióticos y su función más estudiada es la isomerización y rearreglo de puentes disulfuro en proteínas, facilitando el adecuado plegamiento de las proteínas emergentes en el retículo endoplásmico <sup>56</sup>. La PDI ha sido encontrada en la superficie de las células de los mamíferos y en plaquetas, por lo cual se le conoce como PDI de la superficie celular (csPDI) <sup>8, 11, 36</sup>, donde interviene en las propiedades de adhesión celular de la trombospodina <sup>8</sup> y en la activación y agregación de plaquetas <sup>12, 13, 14, 39</sup>. Además de la actividad de intercambio de disulfuros, la PDI también cataliza reacciones involucradas en el metabolismo del NO<sup>•</sup> y de los S-nitrosotioles, llamadas transnitrosaciones y liberación de NO<sup>•</sup> <sup>62, 66, 87</sup>. Estas actividades han sido involucradas en la transferencia de NO<sup>•</sup> desde S-nitrosotioles extracelulares como son el S-nitrosoglutatión y la S-nitrosoalbúmina a sulfhidrilos intracelulares <sup>6, 62, 66</sup>.

Otro sistema enzimático que utiliza al S-nitrosoglutatión, es la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR). Este sistema enzimático cataliza la inactivación del S-nitrosoglutatión (GSNO) dependiente de NADH y glutatión, y es evolutivamente conservado de bacteria a humano <sup>41</sup>. Esta enzima es específica para el GSNO y NADH, amoniaco (NH<sub>3</sub>) y glutatión oxidado (GSSG) son los subproductos principales (Ver Reacción 3) <sup>41</sup>.



A pesar de que la enzima es específica para GSNO, se ha propuesto que interviene en el control de los niveles intracelulares tanto de GSNO y proteínas S-nitrosadas y que protege contra el estrés nitrosante <sup>41</sup>. También la GSNOR ha sido identificada como la formaldehído deshidrogenasa (GS-FDH) dependiente de glutatión y con la alcohol deshidrogenasa clase III (ADH III) <sup>33, 41, 70</sup>.

Se ha propuesto que el significado fisiológico de la GSNOR es la homeostasis de S-nitrosotioles, con un papel protector contra el estrés nitrosante cuando un exceso en la producción de NO<sup>•</sup> está presente <sup>41</sup>, como en el shock por sepsis <sup>42</sup>.

Sin embargo, en pacientes con asma ha sido reportado un incremento en el NO<sup>•</sup> exhalado como un resultado del proceso inflamatorio asociado a las vías aéreas, pero con una disminución en los niveles de S-nitrosoglutatión <sup>21</sup>.

Debido a que el GSNO es un importante broncodilatador de las vías aéreas, los niveles reducidos de este S-nitrosotiol se han involucrado en la fisiopatología de la broncoconstricción asociada al asma <sup>22, 64</sup>. Los niveles bajos de GSNO en el asma, en un principio fueron propuestos como resultado de un incremento en la descomposición enzimática de este nitrosotiol <sup>15</sup>, una hipótesis que fue sustentada más tarde en un modelo animal de esta enfermedad, en el cual también se demostró un incremento en la actividad de la GSNOR <sup>60</sup>.

A pesar de que está bien documentado el papel de los S-nitrosotioles y la actividad de la PDI en la fisiología de la plaqueta, no hay información acerca de la actividad de la GSNOR en estas células anucleadas <sup>60</sup>.

## 2.5 Plaquetas

Las plaquetas son pequeños elementos sanguíneos anucleados (1–3 μm), con una membrana celular que se invagina formando los llamados sistemas canicular de superficie abierto y el tubular denso. El primero constituye una serie de canales abiertos hacia el espacio exterior que facilitan el proceso de secreción y permiten el acceso de sustancias hacia el interior de la plaqueta. El sistema tubular denso se forma de componentes del retículo endoplásmico del megacariocito y constituye el sitio principal de almacenamiento de calcio (Ca<sup>2+</sup>). Inmediatamente, por debajo y alrededor de toda la membrana plasmática, se presenta un haz microtubular y una red de microfilamentos con propiedades contráctiles que constituyen el citoesqueleto de la plaqueta (Ver Figura 15). En el citoplasma

plaquetario se encuentran mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, partículas de glucógeno y diferentes tipos de numerosos gránulos. Los gránulos densos contienen ADP, ATP, serotonina y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), mientras que los llamados gránulos  $\alpha$  (los más numerosos), contienen sustancias vasoactivas y diversas proteínas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ),  $\beta$ -tromboglobulina ( $\beta$ -TG), fibrinógeno, los factores de coagulación V y VIII y proteínas de adhesión <sup>54</sup>.

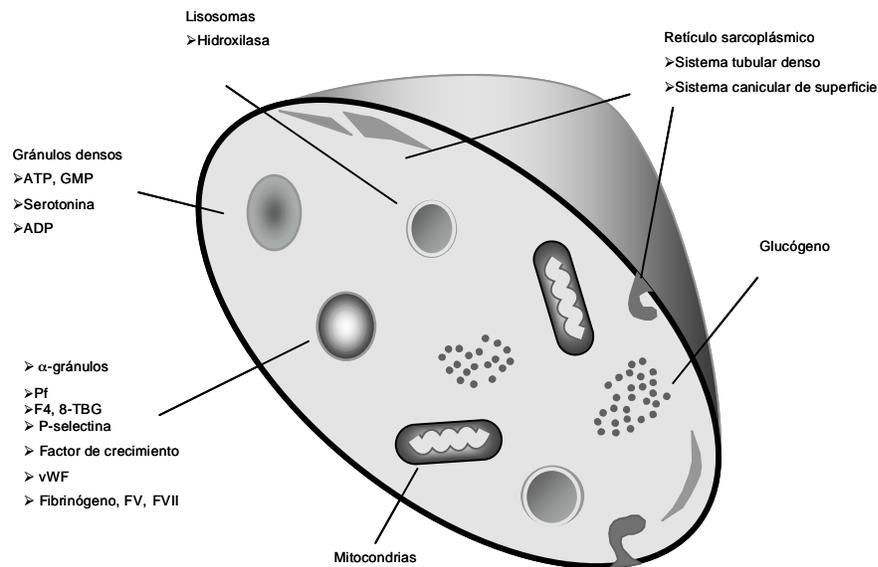


Figura 15 Esquema de la plaqueta humana <sup>75</sup>

Las plaquetas son los principales efectores de la hemostasis y la trombosis en humanos y otros mamíferos; es decir, en el control de la coagulación de la sangre (Ver Figura 16) <sup>10</sup>. Éstas se adhieren a la matriz sub-endotelial expuesta y se agregan en respuesta a señales protrombóticas, contribuyendo a la formación de coágulos de plaqueta-fibrina, los cuales son críticos para la cicatrización de rupturas vasculares, fundamentalmente en la reparación de lesiones en los vasos sanguíneos <sup>85</sup>. Sin embargo, las plaquetas también participan activamente en otros procesos, como los asociados a la inflamación, a través del metabolismo y liberación de mediadores de inflamación como son tromboxanos – particularmente  $\text{TxA}_2$  – y leucotrienos, ambos con propiedades bronco-constrictoras. Las

plaquetas se encuentran activadas debido a su estimulación por el factor activador de plaquetas (PAF) proveniente de otras células inflamatorias. Un ejemplo de este proceso es el asma bronquial <sup>30, 85</sup>.

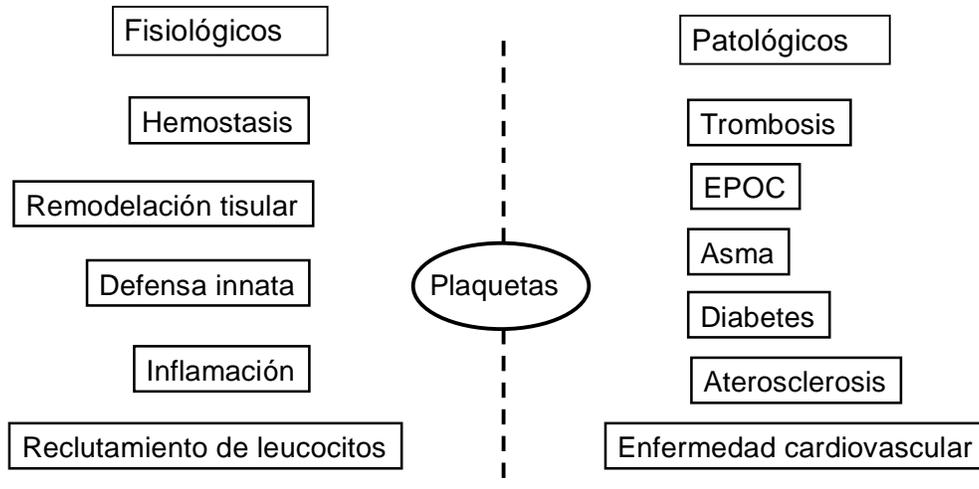


Figura 16 Procesos fisiológicos y patológicos en los que las plaquetas están involucradas <sup>30</sup>

Desde hace más de 20 años se tienen evidencias de la posible participación de las plaquetas en el asma y estudios más recientes han demostrado que intervienen de manera importante en el reclutamiento de células leucocitarias en el pulmón de individuos con este padecimiento <sup>46</sup>. Una de las primeras evidencias de la posible participación de las plaquetas en el asma surge a partir del descubrimiento de la existencia de grandes cantidades de megacariocitos en biopsias de pulmón, obtenidas de pacientes fallecidos por *status asthmaticus*, y de la presencia de agregados plaquetarios con fibrina en la superficie luminal de las vías aéreas dañadas de estos pacientes <sup>5, 46</sup>. Consistente con esta teoría, otros estudios han mostrado activación plaquetaria, tanto en lavados broncoalveolares como en sangre periférica de pacientes alérgicos con asma. Además, es muy importante el papel de las plaquetas en la adhesión y el reclutamiento de los leucocitos en el asma bronquial; las plaquetas son requeridas para el reclutamiento de leucocitos en las vías aéreas en modelos experimentales de asma bronquial y hay una interacción entre leucocitos, plaquetas y células del endotelio vascular en esta enfermedad <sup>26, 53</sup>.

### **3. Parte experimental**

#### **3.1 Diseño del estudio**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental en colaboración con la Clínica de Asma y el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas", cumpliendo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki y la Guía de Buenas Prácticas Clínicas.

El protocolo y el consentimiento informado fueron revisados y aprobados por el Comité Científico y de Bioética del INER. Todos los pacientes firmaron el informe de consentimiento previo a la realización de cualquier estudio del protocolo.

El diseño de este estudio es comparativo, descriptivo y transversal; donde se incluyeron pacientes con asma provenientes de la Clínica de Asma y el grupo control proveniente del Banco de Sangre.

Los criterios de inclusión del grupo de asma fueron: Pacientes con cualquier clase de asma, mayores de 10 años, ambos sexos, que no hayan estado en tratamiento con esteroides sistémicos y que no hayan participado en algún protocolo de investigación en los últimos tres meses previos al estudio.

Los criterios de inclusión del grupo control fueron: Sujetos que cumplieron con las características clínicas del Banco de Sangre.

Los criterios de no inclusión fueron: Se excluyeron pacientes con diagnóstico de neuropatía, retinopatía, hepatopatías, hipotiroidismo, hipertiroidismo, pacientes con tratamiento de esteroides sistémicos en los últimos tres meses previos al estudio, pacientes con infección activa, con diagnóstico de cáncer y VIH positivo.

Se eliminaron aquellos pacientes y controles cuyas muestras no hayan sido analizadas por estar hemolizadas o lipémicas.

### **3.2 Equipos**

Balanza OHAUS (2 kg–5 lb de capacidad), balanza electrónica SCALTEC (d = 0.001 g), balanza analítica electrónica OHAUS Analytical Plus, espectro UV–Visible Genesys 10 uv, espectro UV–Visible BECKMAN COULTER DU 800 SPECTROPHOTOMETER, centrífuga para tubos de ensayo SOLBAT, centrífuga refrigerada para tubos Eppendorf BOECO Germany U–32R, potenciómetro CONDUCTRONIC pH 120, parrilla de agitación CIMAREC Barnstead Thermolyne, parrilla de agitación NUOVA STIRRER Thermolyne, agitador VORTEX GENIE–2.

### **3.3 Preparación de soluciones y de las muestras**

En el apéndice se describe el procedimiento para la preparación de soluciones y de las muestras.

### **3.4 Procedimiento**

En el Diagrama 1 se presenta la metodología que se desarrolló en el presente estudio, la cual comprende la obtención de las muestras de eritrocitos, plasma sanguíneo y plaquetas de sangre periférica obtenida tanto de individuos sanos provenientes del Banco de Sangre (grupo control) como de pacientes con asma

provenientes de la Clínica de Asma (grupo de asma), los cuales son atendidos en el INER. A dichas muestras se les determinaron los grupos sulfhidrilos totales, no proteicos y proteicos mediante el reactivo de Ellman (ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), también se les midió la actividad de la enzima S-nitrosoglutación reductasa (GSNOR) en plaquetas por un método espectrofotométrico, utilizando S-nitrosoglutación y NADH como sustratos (para mayor información, ver el Apéndice).

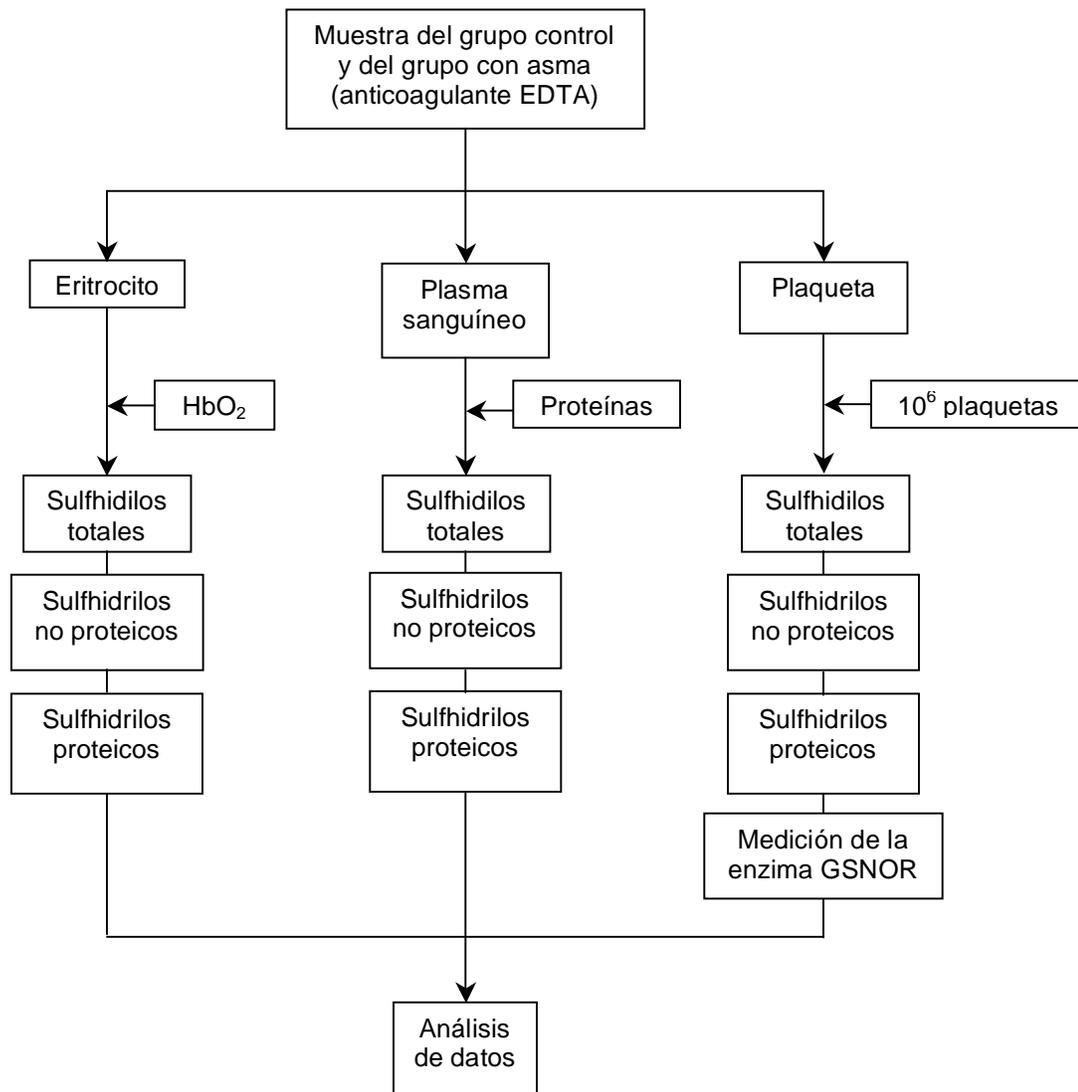


Diagrama 1 Metodología empleada

### **3.5 Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante prueba de Kolmogorov–Smirnov para evaluar el comportamiento de distribución normal de los datos, posteriormente se utilizó la prueba de U–Mann–Whitney para poder observar las diferencias entre los grupos y también se utilizó la correlación de Spearman, considerando una significancia de  $p < 0.05$ . Se empleó el programa Prisma 3.02 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Para la realización de las bases de datos, cálculos y regresiones lineales, se empleó el programa Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Características generales del grupo de asma

En la Tabla 6 se presentan las características generales del grupo de asma.

Tabla 6 Características generales del grupo de asma

Grupo	n	Edad	Hombres (%)	Mujeres (%)	Talla (m)	Peso (kg)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Grado de obesidad	FEV <sub>1</sub> (%)	IgE (UI/mL)	Nº de plaqueta X 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
Asma	58	45±35 (10–76)	22.4	77.6	1.57	67.96	27.6	Grado I (Sobrepeso)	69.7 (Regular)	231.07 (Elevada)	281.21 (Normal)

En el presente estudio se consideraron dos grupos: El grupo control proveniente del Banco de Sangre y el grupo de asma proveniente de la Clínica de Asma. Con respecto al género, en el grupo control predomina el sexo masculino y en el grupo de asma el sexo femenino (Tabla 7, Página 47).

### 4.2 Contenido de sulfhidrilos en el eritrocito, en la plaqueta y en el plasma sanguíneo

Como un parámetro de estrés oxidativo asociado al asma, se estudiaron las posibles alteraciones en los grupos sulfhidrilos (totales, proteicos y no proteicos) en eritrocito, plaqueta y plasma sanguíneo para el grupo control y el grupo de asma. El procedimiento y la memoria de cálculo se desarrollan en el Apéndice.

#### 4.2.1 Contenido de sulfhidrilos en el eritrocito humano

En la Figura 17 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos totales en eritrocito referidos por cantidad de hemoglobina. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

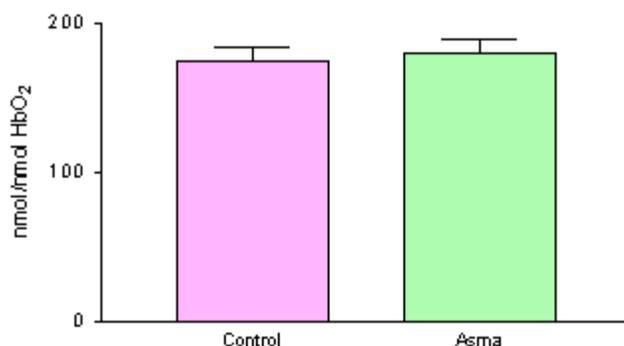


Figura 17 Sulfhidrilos totales en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 18 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos proteicos en eritrocito referidos por cantidad de hemoglobina. Se encontró un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el grupo de asma.

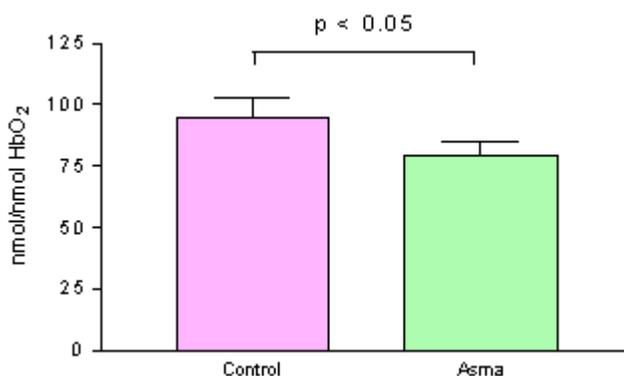


Figura 18 Sulfhidrilos proteicos en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 19 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito referidos por cantidad de hemoglobina. Se encontró un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el grupo de asma.

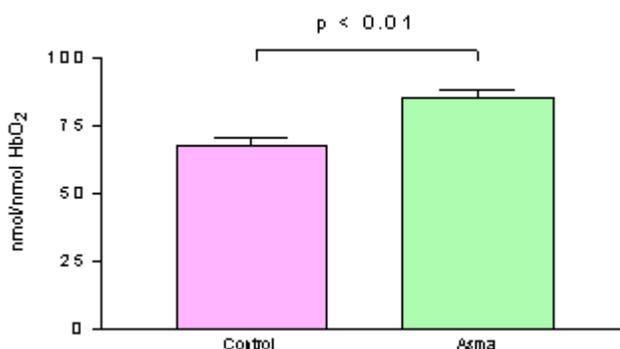


Figura 19 Sulfhidrilos no proteicos en eritrocito en el grupo control y el grupo de asma

#### 4.2.2 Contenido de sulfhidrilos en la plaqueta humana

En la Figura 20 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos totales en plaqueta referidos por número de plaquetas. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

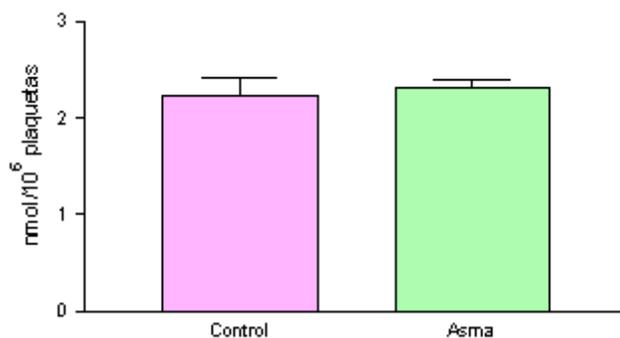


Figura 20 Sulfhidrilos totales en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 21 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos proteicos en plaqueta referidos por número de plaquetas. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

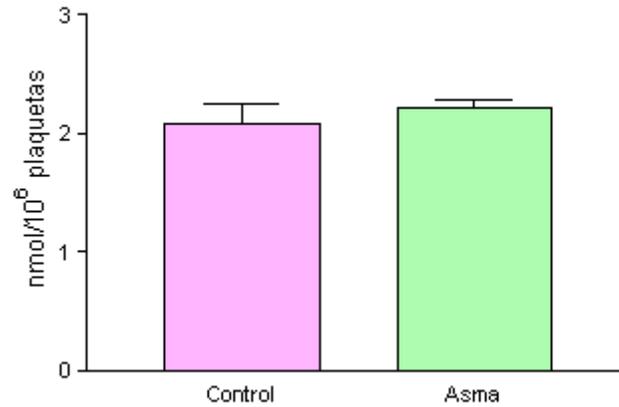


Figura 21 Sulfhidrilos proteicos en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 22 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos no proteicos en plaqueta referidos por número de plaquetas. Se encontró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el grupo de asma.

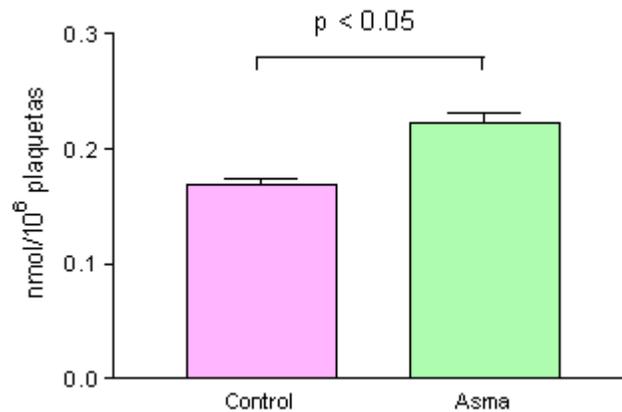


Figura 22 Sulfhidrilos no proteicos en plaqueta en el grupo control y el grupo de asma

### 4.2.3 Contenido de sulfhidrilos en el plasma sanguíneo

En la Figura 23 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo referidos por miligramo de proteína. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

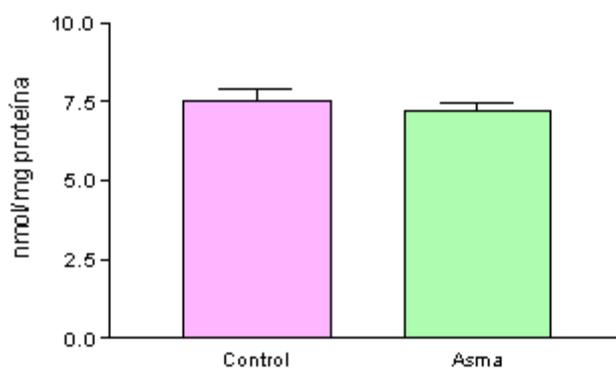


Figura 23 Sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 24 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo referidos por miligramo de proteína. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

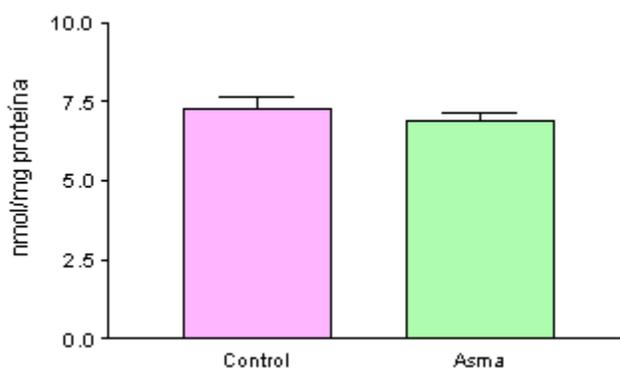


Figura 24 Sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma

En la Figura 25 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo referidos por miligramo de proteína. No se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de asma.

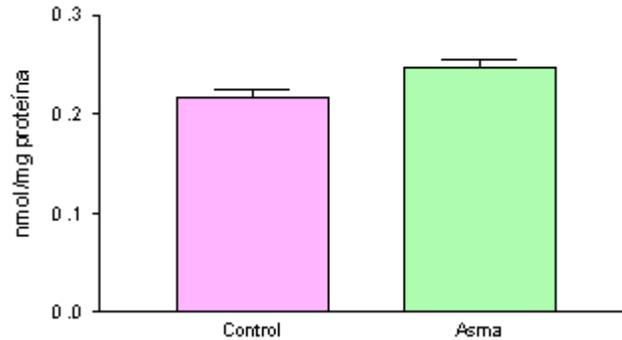


Figura 25 Sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo en el grupo control y el grupo de asma

#### 4.3 Determinación de la actividad de la enzima GSNOR

En la Figura 26 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de asma para la determinación de la enzima GSNOR. Se encontró un decremento significativo ( $p < 0.01$ ) en el grupo de asma.

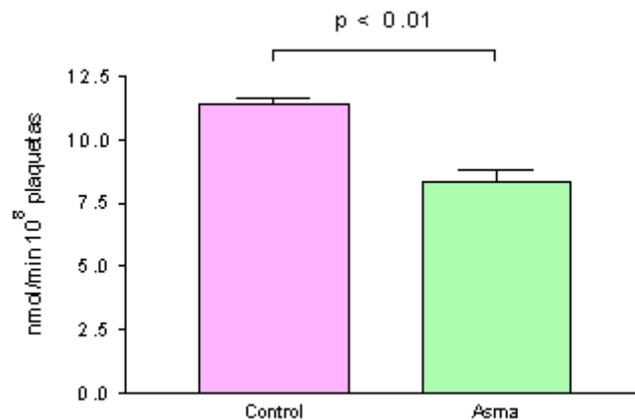


Figura 26 Actividad de la enzima GSNOR en el grupo control y el grupo de asma

Tabla 7 Resumen general de parámetros estudiados

Grupo	Parámetro	GSNOR	ENO	Sulfhidrilos								
				Eritrocito			Plaqueta			Plasma sanguíneo		
				SHT	SHP	SHNP	SHT	SHP	SHNP	SHT	SHP	SHNP
Control	Unidades	(nmol/min 10 <sup>8</sup> plaquetas)	Valores de referencia 5.5 ± 0.5	(nmol SHT-E / nmol HbO <sub>2</sub> )	(nmol SHP-E / nmol HbO <sub>2</sub> )	(nmol SHNP-E / nmol HbO <sub>2</sub> )	(nmol SHT- PLQ / 10 <sup>6</sup> plaquetas)	(nmol SHP- PLQ / 10 <sup>6</sup> plaquetas)	(nmol SHNP- PLQ / 10 <sup>6</sup> plaquetas)	(nmol SHT-P / mg de proteína)	(nmol SHP-P / mg de proteína)	(nmol SHNP- P / mg de proteína)
	Nº de datos	14 <sup>+</sup>	S / D	28	27	28	8	8	9	25	25	26
	Promedio	11.31	S / D	184.10	107.40	70.60	2.37	2.19	0.17	7.60	7.39	0.22
	Desviación estándar	0.88	S / D	52.12	46.20	15.78	0.49	0.47	0.01	1.92	1.91	0.04
	Mediana	11.42 **	S / D	173.80	94.28 *	67.51 **	2.24	2.08	0.17 *	7.54	7.26	0.22
	Error estándar	0.24 **	S / D	9.85	8.89 *	2.98 **	0.17	0.17	0.005 *	0.38	0.38	0.008
Asma	Nº de datos	45	27	58	55	53	48	32	30	54	52	59
	Promedio	9.29	57.43	190.30	79.98	83.67	2.36	2.26	0.22	6.98	6.73	0.24
	Desviación estándar	3.12	44.37	74.15	38.82	18.38	0.54	0.35	0.05	2.04	1.92	0.06*
	Mediana	8.32 **	52.50	179.20	79.29 *	85.21 **	2.32	2.21	0.22 *	7.21	6.91	0.25
	Error estándar	0.47 **	8.54	9.74	5.24 *	2.52 **	0.08	0.06	0.009 *	0.28	0.27	0.007

<sup>+</sup> Estas muestras fueron independientes de las que se emplearon en la determinación de sulfhidrilos

\* p < 0.05: Significancia

\*\* p < 0.01: Significancia

#### 4.4 Correlaciones

En la Figura 27 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR. No se encontró correlación.

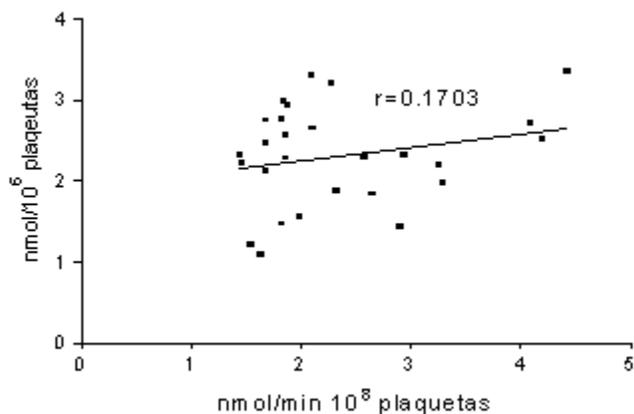


Figura 27 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR

En la Figura 28 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR. No se encontró correlación.

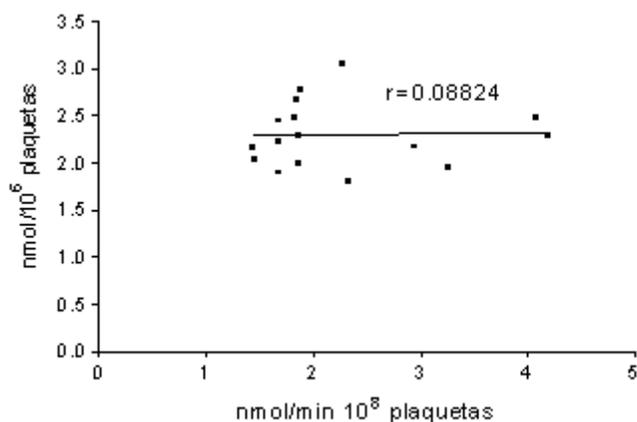


Figura 28 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR

En la Figura 29 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR. No se encontró correlación.

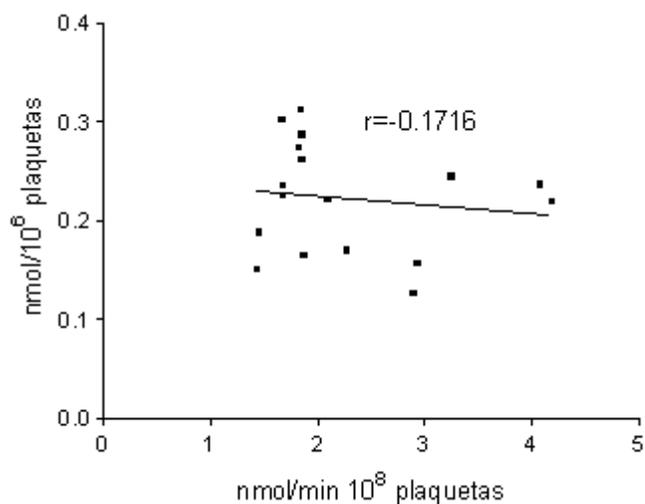


Figura 29 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y la actividad de la enzima GSNOR

En la Figura 30 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y el ENO. No se encontró correlación.

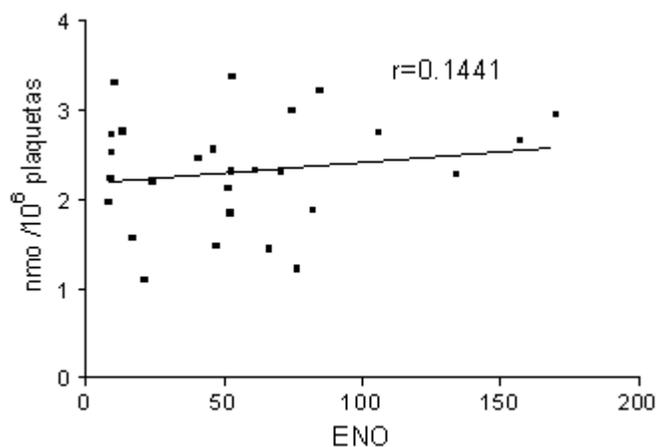


Figura 30 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos totales en plaqueta y el ENO

En la Figura 31 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y el ENO. No se encontró correlación.

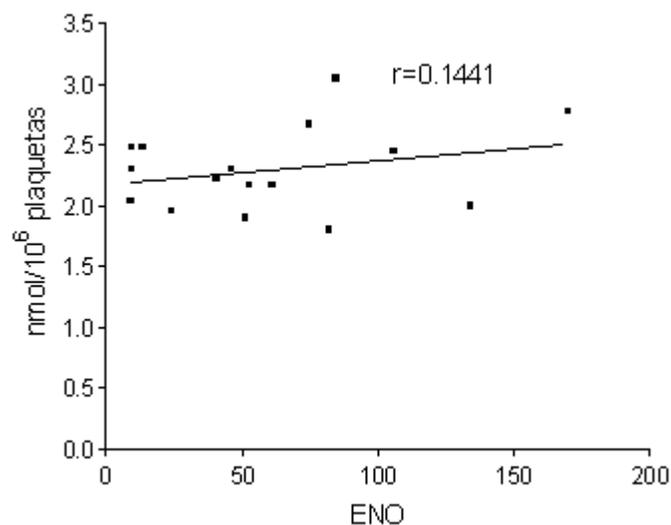


Figura 31 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos proteicos en plaqueta y el ENO

En la Figura 32 se muestra el gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y el ENO. No se encontró correlación.

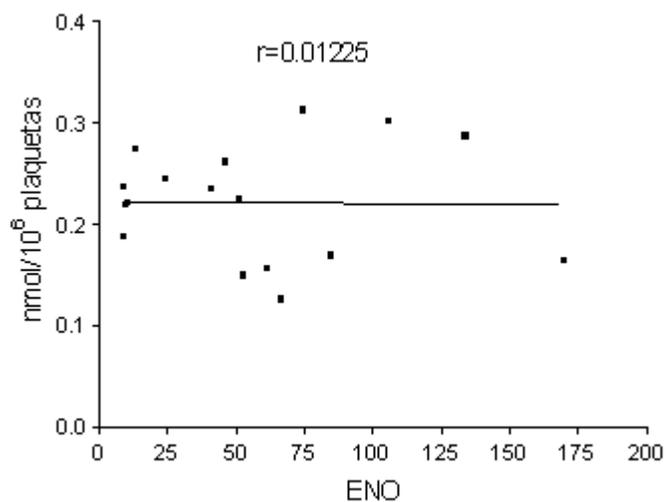


Figura 32 Gráfico de correlación entre los sulfhidrilos no proteicos en plaqueta y el ENO

En la Figura 33 se muestra el gráfico de correlación entre el ENO y la actividad de la enzima GSNOR. No se encontró correlación.

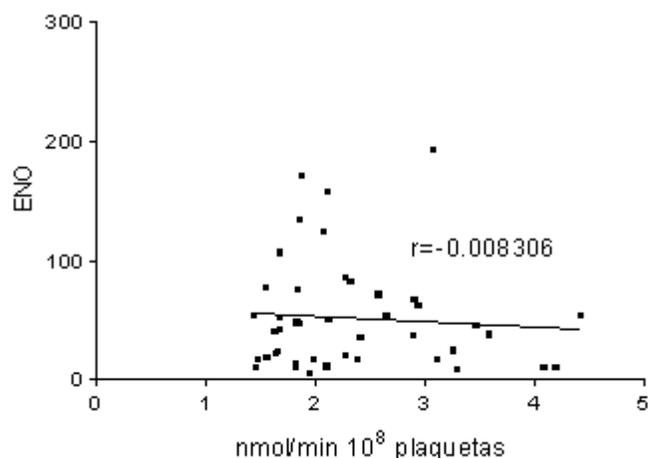


Figura 33 Gráfico de correlación entre el ENO y la actividad de la enzima GSNOR

En la Tabla 8 se observa que no hay correlación entre la actividad de la enzima GSNOR, el óxido nítrico expirado (ENO) y los sulfhidrilos totales, no proteicos y proteicos en plaqueta solo del grupo de asma; para dicho análisis estadístico, se empleó la correlación de Spearman y no se encontró significancia estadística.

Tabla 8 Correlaciones entre GSNOR y ENO contra los sulfhidrilos en plaquetas

Correlación	Correlación	Coeficiente de Spearman (r)
SH-Totales vs GSNOR (n = 27)	No	0.1703
SH-Proteicos vs GSNOR (n = 16)	No	0.08824
SH-No proteicos vs GSNOR (n = 17)	No	-0.1716
SH-Totales vs ENO (n = 27)	No	0.1441
SH-Proteicos vs ENO (n = 16)	No	0.1441
SH-No proteicos vs ENO (n = 17)	No	0.01225
ENO vs GSNOR (n = 43)	No	-0.008306

#### 4.5 Discusión de resultados

Existen diversos estudios que han señalado la existencia de estrés oxidativo en pacientes con asma. Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de estudiar las posibles alteraciones en los grupos sulfhidrilos, como un parámetro de estrés oxidativo asociado a esta enfermedad.

En estudios previos realizados por Nadeem et al.<sup>55</sup>, se observó una disminución en el contenido de sulfhidrilos totales y en el contenido de sulfhidrilos proteicos en el plasma sanguíneo<sup>55</sup>; sin embargo, en el presente estudio no se observaron estas diferencias en las determinaciones del contenido de sulfhidrilos totales en el eritrocito humano, en la plaqueta humana y en el plasma sanguíneo; tampoco se observaron estas diferencias en el contenido de sulfhidrilos proteicos en la plaqueta humana y en el plasma sanguíneo, pero sí se observaron en el eritrocito humano. Con respecto a las determinaciones del contenido de sulfhidrilos en el eritrocito humano, no se observaron diferencias significativas en el contenido de sulfhidrilos totales, mientras que en el contenido de sulfhidrilos proteicos se observó un decremento significativo en el grupo de asma ( $p < 0.05$ ) y un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en el contenido de sulfhidrilos no proteicos del mismo grupo. En el caso de las determinaciones del contenido de sulfhidrilos en la plaqueta humana, no se observaron diferencias significativas en los sulfhidrilos totales y proteicos, pero sí se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en los sulfhidrilos no proteicos en el grupo de asma. En las determinaciones del contenido de sulfhidrilos totales, proteicos y no proteicos en plasma sanguíneo, no se observaron diferencias significativas.

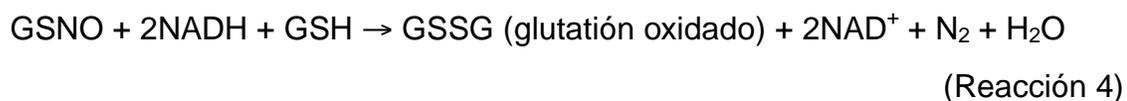
En las determinaciones del contenido de sulfhidrilos no proteicos en el eritrocito humano ( $p < 0.01$ ) y en la plaqueta humana del grupo de asma ( $p < 0.05$ ) hubo un incremento significativo, lo cual es un hallazgo inesperado, porque tradicionalmente se ha considerado que el contenido de sulfhidrilos no proteicos, principalmente el glutatión reducido, es uno de los principales sistemas

antioxidantes no enzimáticos y que frecuentemente se encuentra disminuido en patologías asociadas al estrés oxidativo.

La razón por la cual los pacientes asmáticos tuvieron un incremento en el contenido de sulfhidrilos no proteicos en el eritrocito humano y en la plaqueta humana se desconoce; sin embargo, otros estudios han demostrado que en el asma se presenta un incremento en la síntesis del glutatión reducido en los pulmones, sobre todo durante los episodios de crisis asmática, lo cual se ha interpretado como una respuesta de protección compensatoria ante un episodio de estrés oxidativo crónico <sup>55</sup>. De cualquier manera, se desconoce si esta síntesis incrementada en el pulmón se manifieste en un incremento de glutatión reducido en el eritrocito humano, en la plaqueta humana y en el plasma sanguíneo, como la que se observó en el presente trabajo y tampoco si el incremento del glutatión reducido es debido a un incremento en el glutatión total en estos pacientes. Por el momento, no se han realizado estudios que relacionen que el uso de broncodilatadores pueda interferir en una mayor producción del contenido de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito humano, en la plaqueta humana y en el plasma sanguíneo.

Con respecto a la enzima GSNOR, en la hipótesis del presente trabajo, se postuló que en las plaquetas de los pacientes con asma existiría una mayor actividad de la enzima GSNOR, lo cual podría contribuir a una inactivación del bronco-relajante S-nitrosoglutatión.

Este planteamiento se realizó considerando que esta enzima posee una actividad “destructora” del óxido nítrico presente en el S-nitrosoglutatión, es decir, que cataliza la siguiente reacción:



tal como ha sido sugerido que sucede en el pulmón de individuos con asma, por el grupo de investigación encabezado por Stamler <sup>77</sup>. Sin embargo, en el presente

trabajo encontramos que la actividad de la enzima GSNOR fue menor en las plaquetas de pacientes con asma. Ante esta aparente discrepancia, se realizó un estudio adicional para determinar si la actividad de la enzima GSNOR que se midió en las plaquetas, efectivamente inactivaba y no liberaba al óxido nítrico presente en el S-nitrosoglutatión. Los resultados obtenidos, aunque muy preliminares y que no se muestran en el presente trabajo, indican que no existe tal actividad de inactivación, sino que se presenta una actividad de liberación de óxido nítrico en los lisados de plaquetas con las siguientes características: 1) Utilización de diversos S-nitrosotioles tanto proteicos (S-nitroso suero-albúmina y S-nitroso ovoalbúmina) como no proteicos (S-nitrosoglutatión, S-nitrosocisteína, S-nitroso-N-acetilcisteína y S-nitrosomercaptoetanol), con características de saturación y afinidades similares; 2) utilización de la coenzima NADH pero no de NADPH como agente reductor; 3) no requerimiento de glutatión reducido; 4) insensibilidad hacia agentes alquilantes de grupos sulfhidrilos, indicando la no participación de estos grupos en esta actividad enzimática; 5) liberación de la actividad con el detergente Tritón X-100 a concentraciones mayores a 0.025%, pero no mediante la permeabilización con digitonina 10  $\mu$ M, indicando la asociación de la actividad enzimática con sistemas membranales de la plaqueta.

De acuerdo a estos resultados preliminares, la actividad de la enzima GSNOR presente en la plaqueta humana representaría una actividad de S-nitrosoglutatión: Óxido nítrico liasa, liberadora de óxido nítrico, tal como se ha propuesto para la enzima proteína disulfuro isomerasa (PDI)<sup>62, 87</sup> y se asemeja a la reacción:



Esta actividad enzimática podría participar en la liberación de óxido nítrico intracelular a partir de S-nitrosotioles en la plaqueta, y con ello, disminuir la activación de estas células. Si esto es así, una deficiencia en la actividad de esta enzima contribuiría al establecimiento de una condición de hiperactividad plaquetaria, lo cual se sabe que existe en los pacientes con asma<sup>30</sup>.

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que hay un incremento en el grupo de asma en las determinaciones de los sulfhidrilos no proteicos en eritrocito y en plaqueta, probablemente por un incremento en la síntesis del glutatión reducido y como una respuesta compensatoria al estrés oxidativo crónico presente en el asma.

La plaqueta está dotada de una actividad de la enzima S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) la cual fue menor en las plaquetas del grupo de asma, probablemente esto represente una menor capacidad de liberar óxido nítrico a partir de S-nitrosoglutatión por parte de la plaqueta de pacientes con asma. Esta condición podría contribuir a la hiperreactividad de las vías aéreas y/o de las plaquetas en el asma. Nuestros resultados también muestran la existencia de una actividad importante de S-nitrosoglutatión reductasa dependiente de NADH en la plaqueta humana y que esta actividad tiene características diferentes a las anteriormente documentadas en otras estirpes celulares.

### 5.1 Perspectivas

Debido a que se han documentado varios sistemas enzimáticos con propiedades de S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) en otras estirpes celulares y en diversas especies, se considera importante el caracterizar esta actividad recientemente descubierta en la plaqueta humana, con el propósito de tener los elementos necesarios para asignarle un significado fisiopatológico en el asma.

En la actualidad estamos estudiando la actividad de esta enzima en pacientes con asma, ya que estudios con modelos animales la han relacionado con la bronco-constricción asociada a este padecimiento.

## 6. Apéndice

### 6.1 Preparación de las muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción y colocadas en un tubo con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético).

Se tomaron 4 mL de sangre periférica, se centrifugó a 150 g (fuerza centrífuga relativa) durante 15 minutos y se recolectaron 3/4 partes del plasma sanguíneo. Posteriormente se obtuvieron los eritrocitos y el plasma sanguíneo. Este plasma se consideró como el plasma rico en plaquetas (PRP).

Los eritrocitos se lavaron utilizando la Solución de Hepes–Tyrode–Glucosa 5 mM (1 mg de glucosa/mL), se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos y se realizó 2 veces el lavado para eliminar los residuos de plasma sanguíneo, plaquetas y células de la serie blanca.

El PRP se centrifugó a 150 g durante 7 minutos, se recolectó el sobrenadante y se realizó la lectura a 600 nm con el propósito de medir la concentración de plaquetas por turbidez (ver más adelante). Se tomó 1 mL del PRP, se colocó en un tubo de vidrio y se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante que es el plasma pobre en plaquetas (PPP) y se realizó la lectura a 600 nm. De aquí se obtuvo el paquete de plaquetas y el PPP.

A partir del PPP obtenido, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se obtuvo el plasma sanguíneo libre de plaquetas para la prueba de sulfhidrilos.

### 6.1.1 Preparación del lisado de plaquetas

El volumen de lisis de las plaquetas se obtuvo restando la absorbencia del plasma rico en plaquetas (PRP) menos la absorbencia del plasma pobre en plaquetas (PPP) y el resultado se multiplica por 500 (Ver Fórmula “a”).

$$(PRP - PPP) * 500 = \text{Volumen de lisis } (\mu\text{L}) \quad (\text{a})$$

Se propuso para una diferencia de 0.5 de absorbencia que las plaquetas se lisaran con 250  $\mu\text{L}$  de la solución TRIS 50 mM–EDTA 0.5 mM–Tx 100 pH 8.0. Siendo  $A_s$  la diferencia de absorbencia del PRP – PPP (Ver Fórmula “b”).

$$[(A_s * 250) / 0.5] = A_s * 500 \quad (\text{b})$$

### 6.2 Determinación de la concentración de plaquetas

Con el propósito de facilitar las mediciones de las concentraciones de plaquetas en nuestras muestras se desarrolló e implementó un método turbidimétrico para este propósito. Para ello se midieron las concentraciones de plaquetas en cinco diferentes muestras de plasma rico en plaquetas, utilizando un hemocitómetro.

Posteriormente se hicieron diferentes diluciones de las muestras del plasma rico en plaquetas, a las cuales se les midió su turbidez a 600 nm, y a las cuales se les restó los valores de absorbencia correspondientes al plasma pobre en plaquetas en cada dilución. Posteriormente se realizó un análisis gráfico para correlacionar los valores de turbidez ( $A_s$  a 600 nm) con la concentración de plaquetas determinadas con el hemocitómetro y de esta manera se obtuvo la curva estándar.

En la Tabla 9 y en la Figura 27 se reportan los resultados empleados en la curva estándar para la determinación de la concentración de plaquetas.

Tabla 9 Valores de la curva estándar para determinar la concentración de plaquetas

Nº de plaquetas/ $\mu$ L	Absorbencia (As)
76000	0.37
96000	0.49
120000	0.55
150000	0.68
190000	0.80
237000	0.95
285000	1.10

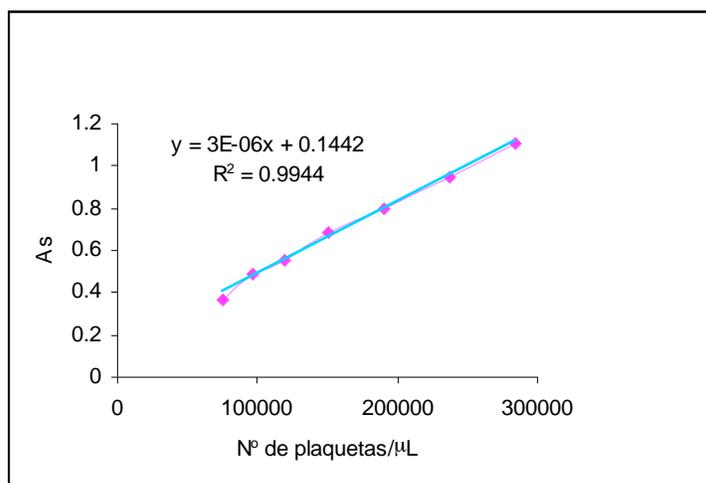


Figura 34 Curva estándar para determinar la concentración de plaquetas

Para determinar el número de plaquetas/mL, se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\left[ \left[ \frac{(PRP - PPP) - 0.1442}{3} \right] \times 10^6 \right] \times 1000 = N^{\circ} \text{ plaquetas} / \text{mL} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Sustituyendo por el valor propuesto de 0.5 de absorbencia en la Ecuación 1, tenemos que:

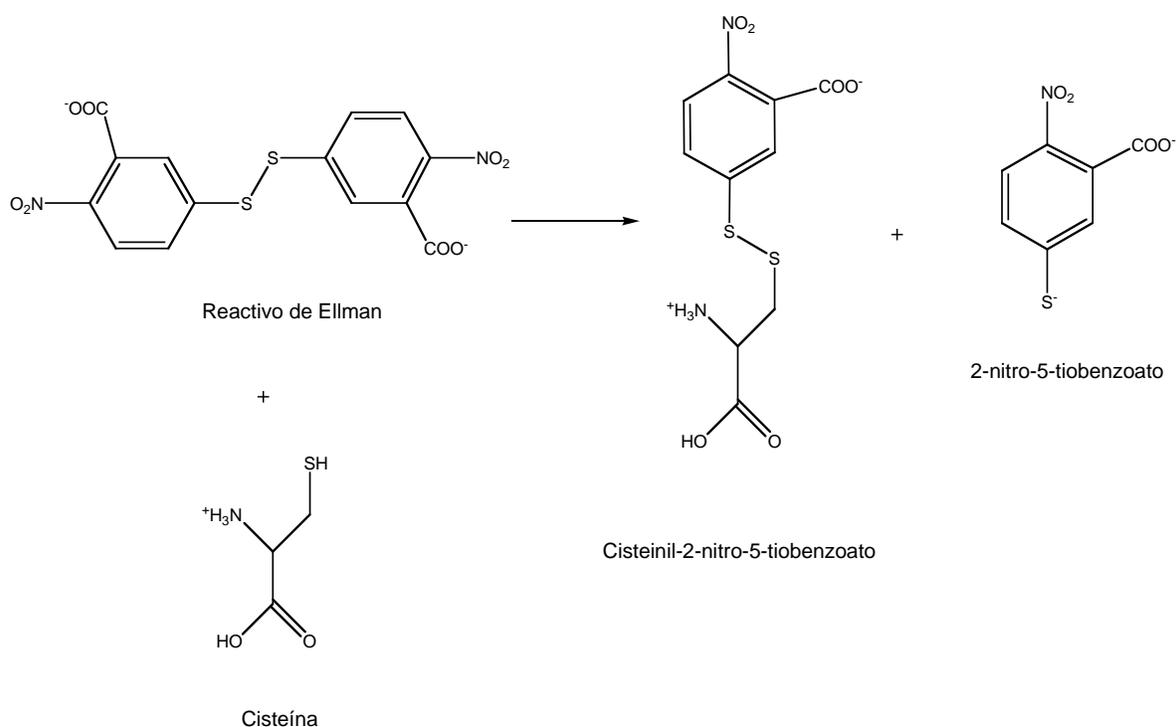
$$\left[ \left[ \frac{(0.5) - 0.1442}{3} \right] \times 10^6 \right] \times 1000 = 118.6 \times 10^6 \text{ plaquetas} / \text{mL} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Luego es necesario multiplicar por 0.25 ó dividir entre 4 los resultados de los sulfhidrilos en plaqueta y los resultados de la enzima GSNOR para obtener los lisados correspondientes a una concentración de  $474.4 \times 10^6$  plaquetas/mL.

### 6.3 Determinación de grupos sulfhidrilos

#### 6.3.1 Fundamento

Los grupos sulfhidrilos totales fueron determinados mediante el reactivo de Ellman (DTNB; ácido 5, 5' ditiobis-2-nitrobenzoico). El reactivo de Ellman es usado para la modificación de tioles libres en proteínas, formando rápidamente puentes disulfuro con el tiol y liberando el ion tiolato, el cual da un color amarillo en medio alcalino (Ver Reacción 6). La absorbencia máxima del ion tiolato es a  $412 \text{ nm}$ <sup>31</sup>.



(Reacción 6)

Se realizó una curva estándar para determinar la cantidad total de tioles libres presentes en las proteínas. Las lecturas de absorbencia se realizaron en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV, Thermo Electron Corporation a una longitud de onda de 412 nm.

#### 6.4. Determinación de grupos sulfhidrilos en eritrocito

##### 6.4.1 Determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito

Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del paquete de eritrocitos y se lisaron adicionando 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. Posteriormente se resuspendieron y se colocaron sobre hielo para enfriarlos (no se centrifugaron).

Procedimiento: En la Tabla 10 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito. La adición de acetonitrilo fue para precipitar a la hemoglobina y evitar su interferencia en la determinación espectrofotométrica.

Tabla 10 Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito

	Blanco	Problema
Lisado de eritrocitos	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
TRIS 0.1 M, pH 8.2	500 $\mu\text{L}$	450 $\mu\text{L}$
DTNB 0.4 mM	-----	50 $\mu\text{L}$
- Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.		
Acetonitrilo	1 mL	1 mL
Volumen total	1550 $\mu\text{L}$	1550 $\mu\text{L}$
- Se agitó suavemente y se enfrió colocándolo sobre hielo durante 10 minutos protegido de la luz.		
- Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4° C.		
- Se recolectó el sobrenadante (SN).y se realizaron las lecturas a 412 nm.		

### Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito

Procedimiento: En la Tabla 11 y 12, y en la Figura 28 se describen los pasos que se realizaron en la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito y se muestran los valores obtenidos para la curva estándar.

Tabla 11 Preparación de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito.

Tubo	Cisteína 250 $\mu$ M (250 nmol/mL)	TRIS 0.1 M pH 8.2	DTNB 0.4 mM	Acetonitrilo
Blanco	-----	500 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
1	10 $\mu$ L (2.5 nmol)	490 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
2	20 $\mu$ L (5.0 nmol)	480 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
3	50 $\mu$ L (12.5 nmol)	450 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
4	100 $\mu$ L (25.0 nmol)	400 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL
5	150 $\mu$ L (37.5 nmol)	350 $\mu$ L	50 $\mu$ L	1 mL

- Se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos protegido de la luz.  
- Se realizaron las lecturas a 412 nm.

Tabla 12 Valores de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito

Cisteína (nmol)	Absorbencia (As)
0.0	0.000
2.5	0.019
5.0	0.040
12.5	0.118
25.0	0.234
37.5	0.337

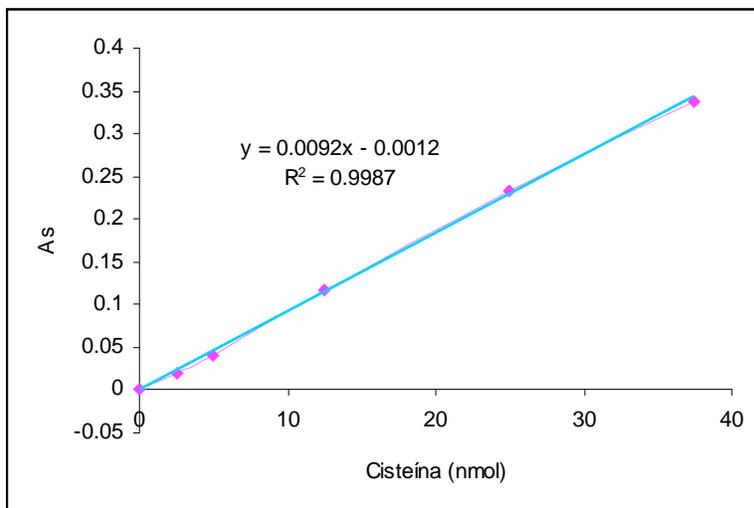


Figura 35 Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en eritrocito

### Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en eritrocito/nmol HbO<sub>2</sub>

De la curva estándar que se realizó (ver Figura 28) se obtuvo la ecuación de la recta (Ver Ecuación 3): Donde  $y$  es la absorbancia ( $A_s$ ) y  $x$  son los nmol de cisteína.

$$y = 0.0092x - 0.0012 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Se despejó la  $x$  y se multiplicó por el factor 20 para obtener los nmol de SH<sub>totales</sub>/mL presentes en el lisado de eritrocitos (Ver Ecuación 4).

$$x = [(A_s + 0.0012) / 0.0092] * 20 = \text{nmol de SH}_{\text{totales}}/\text{mL de lisado} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Obtención del factor 20: Se dividieron 1000  $\mu\text{L}$ /50  $\mu\text{L}$  = 20, porque 1000  $\mu\text{L}$  = 1mL y 50  $\mu\text{L}$  es el volumen que se tomó del lisado de eritrocitos para realizar la prueba de grupos sulfhidrilos totales.

Para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en eritrocito/nmol HbO<sub>2</sub> se dividió el valor obtenido en la Ecuación 4 entre el valor obtenido de la Ecuación 8, quedando como indica la Ecuación 5.

$$\frac{SH_{\text{totales}}\left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}}\right)}{HbO_2\left(\frac{\mu\text{mol}}{L}\right)} \times 10^3 = \frac{\text{nmol}SH_{\text{totales}}}{\text{nmol}HbO_2} \quad (\text{Ecuación 5})$$

#### 6.4.2 Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en eritrocito

Los grupos sulfhidrilos proteicos se obtuvieron de la diferencia entre los grupos sulfhidrilos totales y los sulfhidrilos no proteicos (Ver Fórmula “c”):

$$SH_{\text{proteicos}}_{\text{eritrocito}} = SH_{\text{totales}}_{\text{eritrocito}} - SH_{\text{no proteicos}}_{\text{eritrocito}} \quad (\text{c})$$

#### 6.4.3 Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito

Para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito, se precipitó la hemoglobina con ácido tricloroacético a una concentración del 20% (p/v), (TCA 20%), y los grupos sulfhidrilos se determinaron en el sobrenadante de los eritrocitos, del plasma sanguíneo y de las plaquetas.

Procedimiento: En la Tabla 13 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos no proteicos en eritrocito, plasma sanguíneo y plaqueta.

El sulfamato de amonio se adicionó para evitar la reacción de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) presentes como contaminantes en las muestras con los sulfhidrilos en medio ácido, el cual reacciona con el ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) que se forma. Porque, si hay residuos de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) contaminantes, aún en pequeña cantidad, estos

reaccionan con los R–SH que se desean medir; por lo tanto se subestimarán los R–SH <sup>71</sup>.

Tabla 13 Preparación de las muestras para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito

Lisado de eritrocitos	200 µL	
Sulfamato de amonio 10 mM	100 µL	
H <sub>2</sub> O desionizada	450 µL	
TCA 20%	250 µL	
- Se agitó y se colocó sobre hielo para enfriar durante 5 minutos. - Se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 minutos a 4° C. - Se recolectó el sobrenadante (SN).		
	Blanco	Problema
SN	250 µL	250 µL
TRIS 0.4 M, pH 9.5	500 µL	500 µL
- Se agitó y posteriormente se agregó DTNB 0.4 mM.		
DTNB 0.4 mM	-----	50 µL
- Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.		
Metanol absoluto	500 µL	450 µL
Volumen total	1250 µL	1250 µL
- Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. - Se realizaron las lecturas a 412 nm.		

### Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito

Procedimiento: En la Tabla 14 y 15, y en la Figura 29 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito y se muestran los valores obtenidos para la curva estándar.

Tabla 14 Preparación de la curva estándar para la determinación de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito

Tubo	Cisteína 250 nmol/mL (250 µM)	Sulfamato de amonio 10 mM	H <sub>2</sub> O desionizada	TCA 20%	TRIS 0.4 M pH 9.5	DTNB 0.4 mM	Metanol absoluto
Blanco	-----	25 µL	163 µL	62 µL	500 µL	-----	500 µL
1	10 µL (2.5 nmol)	25 µL	153 µL	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL
2	20 µL (5.0 nmol)	25 µL	143 µL	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL
3	30 µL (7.5 nmol)	25 µL	133 µL	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL
4	50 µL (12.5 nmol)	25 µL	113 µL	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL
5	100 µL (25.0 nmol)	25 µL	63 µL	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL
6	163 µL (40.75 nmol)	25 µL	-----	62 µL	500 µL	50 µL	450 µL

Tabla 15 Determinación de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito

Cisteína (nmol)	Absorbencia (As)
0.0	0.0000
2.5	0.0185
5.0	0.0440
7.5	0.0600
12.5	0.1140
25.0	0.2270
40.7	0.3505

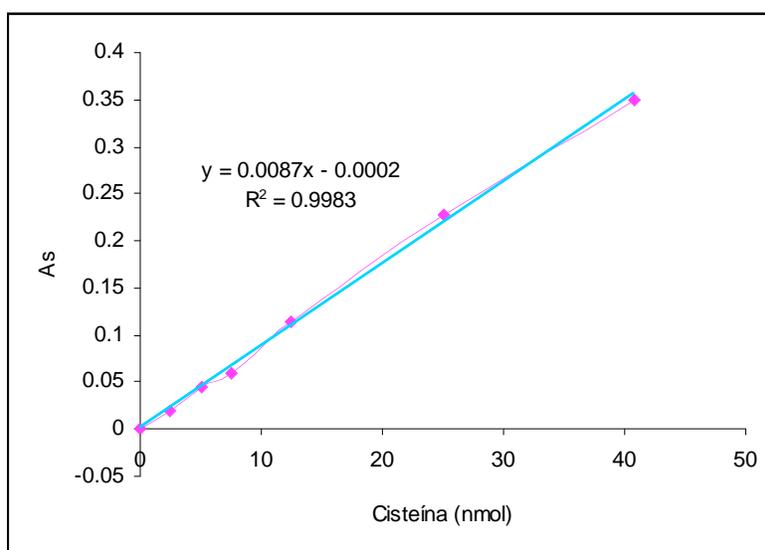


Figura 36 Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en eritrocito.

### Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito/nmol HbO<sub>2</sub>

De la curva estándar que se realizó (Ver Figura 29) se obtuvo la ecuación de la recta, (Ecuación 6): Donde  $y$  es la absorbancia ( $A_s$ ) y  $x$  son los nmol de cisteína.

$$y = 0.0087x - 0.0002 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Se despejó a  $x$  y se multiplicó por el factor 20 para obtener los nmol de SH no proteicos/mL presentes en el lisado de eritrocitos (Ver Ecuación 7).

$$x = [(A_s + 0.0002) / 0.0087] * 20 = \text{nmol de SH}_{\text{no proteicos}}/\text{mL} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Obtención del factor 20: Los nmol obtenidos en la Ecuación 7, corresponden a los nmol presentes en 250  $\mu\text{L}$  del desproteinado, el cual fue diluido (por el proceso de desproteización) 4 veces. Luego, para obtener los nmol presentes en el lisado de eritrocitos se multiplicó por 4 y éstos correspondieron a los nmol presentes en 200  $\mu\text{L}$  del lisado de eritrocitos. Como se deseaban obtener los nmol de SH<sub>no proteicos</sub>/mL del lisado de eritrocitos, el resultado anterior se multiplicó por 5, debido a que 200  $\mu\text{L}$  es la quinta parte de 1 mL.

#### 6.4.4 Determinación de oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>)

Se realizó una dilución 1:500 del lisado de eritrocitos con amortiguador de fosfatos pH 7.0, para la cual se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del lisado de eritrocitos y se adicionaron 490  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos pH 7.0 (dilución 1:50).

De la dilución anterior, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se adicionaron 900  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfatos pH 7.0 (dilución 1:500), posteriormente se realizó un espectro desde 500 nm hasta 700 nm y se leyeron picos a 540 nm y a 574 nm<sup>74</sup>.

Para determinar la concentración de HbO<sub>2</sub> se utilizó la Ecuación 8:

$$\left[ \frac{\left[ \frac{As}{13900} \right]_{540nm} + \left[ \frac{As}{14400} \right]_{574nm}}{2} \right] 500 \times 10^6 = \text{HbO}_2 \mu\text{M} \quad (\text{Ecuación 8})$$

### 6.4.5 Determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta

Procedimiento: En la Tabla 16 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaquetas.

Tabla 16 Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta

	Blanco	Problema
Lisado de plaquetas	-----	50 µL
TRIS 0.1 M, pH 8.2	500 µL	450 µL
- Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.		
DTNB 0.4 mM	50 µL	50 µL
Metanol absoluto	450 µL	450 µL
Volumen total	1 mL	1 mL
- Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. - Posteriormente se colocó sobre hielo durante 30 minutos. - Se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 minutos. - Se recolectó el sobrenadante (SN). - Se realizaron las lecturas a 412 nm.		

### Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales plaqueta

Procedimiento: En la Tabla 17 y 18, y en la Figura 30 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta y se muestran los valores obtenidos para la curva estándar.

Tabla 17 Preparación de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta

Tubo	Cisteína 250 $\mu$ M (250 nmol/mL)	TRIS 0.1 M pH 8.2	DTNB 0.4 mM	Metanol absoluto
Blanco	-----	500 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
1	10 $\mu$ L (2.5 nmol)	490 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
2	20 $\mu$ L (5.0 nmol)	480 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
3	30 $\mu$ L (7.5 nmol)	470 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
4	50 $\mu$ L (12.5 nmol)	450 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L
5	80 $\mu$ L (20.0 nmol)	420 $\mu$ L	50 $\mu$ L	450 $\mu$ L

- Se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.  
- Posteriormente se realizaron las lecturas a 412 nm.

Tabla 18 Valores de la curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta

Cisteína (nmol)	Absorbencia (As)
0.0	0.000
2.5	0.025
5.0	0.071
7.5	0.107
12.5	0.149
20.0	0.256

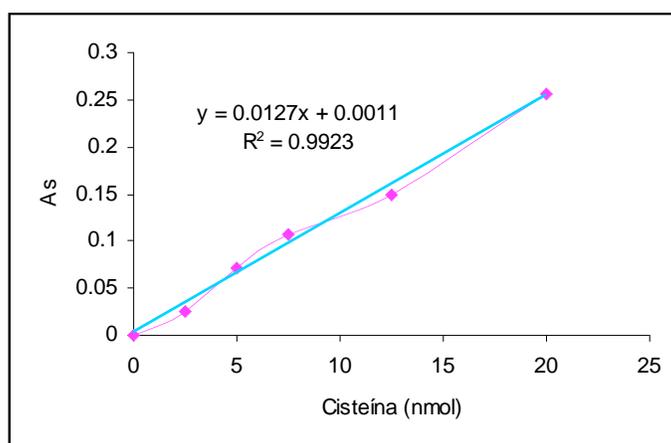


Figura 37 Curva estándar para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plaqueta

## Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en plaquetas/ $10^6$ plaquetas

De la curva estándar que se realizó (Ver Figura 30) se obtuvo la ecuación de la recta, (Ver Ecuación 9): Donde  $y$  es la absorbencia (As) y  $x$  son los nmol de cisteína.

$$y = 0.0127x + 0.0011 \quad (\text{Ecuación 9})$$

Se despejó a  $x$  y se multiplicó por el factor 20 para obtener los nmol de SH totales/mL presentes en las plaquetas (Ver Ecuación 10).

$$x = [(As - 0.0011) / 0.00127] * 20 = \text{nmol de SH}_{\text{totales}}/\text{mL de lisado} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Obtención del factor 20: Se dividieron  $1000 \mu\text{L}/50 \mu\text{L}$ , porque  $1000 \mu\text{L} = 1\text{mL}$  y  $50 \mu\text{L}$  es el volumen que se tomó del lisado de plaquetas para realizar la prueba de grupos sulfhidrilos totales.

Para determinar el número de plaquetas presentes en  $50 \mu\text{L}$  ( $0.05 \text{mL}$ ) del lisado, utilizado para la determinación de sulfhidrilos totales en plaquetas, se empleó la ecuación 11:

$$\frac{N^{\circ} \text{ plaquetas} / \text{mL}}{\text{Volumen de Lisis}(\text{mL})} \times 0.05\text{mL} = N^{\circ} \text{ plaquetas} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en plaqueta/ $10^6$  plaquetas se dividió el valor obtenido en la Ecuación 10 entre el valor obtenido de la Ecuación 11 y se multiplicó por 0.25, como lo indica la Ecuación 12:

$$\frac{SH_{\text{totales}} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right)}{N^{\circ} \text{ plaquetas}} \times 0.25 \times 10^6 = \frac{\text{nmol} SH_{\text{totales}}}{10^6 \text{ plaquetas}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

#### 6.4.6 Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en plaqueta

Los grupos sulfhidrilos proteicos se obtuvieron de la diferencia entre los grupos sulfhidrilos totales y los sulfhidrilos no proteicos para plaqueta (Ver Fórmula “d”):

$$SH_{\text{proteicos}}_{\text{plaqueta}} = SH_{\text{totales}}_{\text{plaqueta}} - SH_{\text{no proteicos}}_{\text{plaqueta}} \quad (\text{d})$$

#### 6.4.7 Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plaqueta

Para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plaqueta, se utilizó la metodología descrita en la Tabla 13 y 14, y los resultados de la Tabla 15 y Figura 29, cambiando el lisado de eritrocitos por un lisado de plaquetas.

#### Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en plaqueta/ $10^6$ plaquetas

Como se realizó el mismo procedimiento empleado para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito, se aplicó la Ecuación 7:

$$x = [(As + 0.0002) / 0.0087] * 20 = \text{nmol de } SH_{\text{no proteicos}}/\text{mL} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en plaqueta/ $10^6$  plaquetas se dividió el valor obtenido en la Ecuación 7 para plaquetas entre el valor obtenido de la Ecuación 11 y se multiplicó por 0.25, como lo indica la Ecuación 13:

$$\frac{SH_{noproteicos} \left( \frac{nmol}{mL} \right)}{N^{\circ} \text{ plaquetas}} \times 0.25 \times 10^{-6} = \frac{nmol SH_{noproteicos}}{10^6 \text{ plaquetas}} \quad (\text{Ecuación 13})$$

#### 6.4.8 Determinación de grupos sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo

Procedimiento: En la Tabla 19 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo.

Tabla 19 Preparación de la muestra para la determinación de grupos sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo

	Blanco	Problema
Plasma sanguíneo	50 µL	50 µL
TRIS 0.1 M, pH 8.2	400 µL	450 µL
DMB 5mM	50 µL	-----
- Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.		
DTNB 0.4 mM	50 µL	50 µL
Metanol absoluto	450 µL	450 µL
Volumen total	1 mL	1 mL
- Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. - Posteriormente se enfrió colocándolo sobre hielo durante 30 minutos. - Se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 minutos. - Se realizaron las lecturas del sobrenadante (SN) a 412 nm.		

#### Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo/mg de proteína

Como se realizó el mismo procedimiento empleado para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en plaqueta, se aplicó la Ecuación 10:

$$x = [(As - 0.0011) / 0.00127] * 20 = nmol \text{ de } SH_{\text{totales}}/mL \text{ de plasma} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Para la determinación de nmol de sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo/mg de proteína se dividió el valor obtenido en la Ecuación 10 entre 76.37 mg/mL (Ver Tabla P), como indica la Ecuación 14.

$$\frac{SH_{\text{totales}}\left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}}\right)}{76.37\left(\frac{\text{mgproteína}}{\text{mL}}\right)} = \frac{\text{nmolSH}_{\text{totales}}}{\text{mgproteína}} \quad (\text{Ecuación 14})$$

#### 6.4.9 Determinación de grupos sulfhidrilos proteicos en plasma sanguíneo

Los grupos sulfhidrilos proteicos se obtuvieron de la diferencia entre los grupos sulfhidrilos totales y los sulfhidrilos no proteicos, tanto para eritrocito, plasma sanguíneo y plaqueta (Ver Fórmula “e”):

$$SH_{\text{proteicos}}_{\text{plasma}} = SH_{\text{totales}}_{\text{plasma}} - SH_{\text{no proteicos}}_{\text{plasma}} \quad (\text{e})$$

#### 6.4.10 Determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo

Para la determinación de grupos sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo, se utilizó la metodología descrita en la Tabla 13 y 14, y los resultados de la Tabla 15 y Figura 29, cambiando el lisado de eritrocitos por el plasma sanguíneo.

#### Memoria de cálculo para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en plasma sanguíneo/mg proteína

Como se realizó el mismo procedimiento empleado para la determinación de nmol de sulfhidrilos no proteicos en eritrocito, se aplicó la Ecuación 7:

$$x = [(As + 0.0002) / 0.0087] * 20 = \text{nmol de SH}_{\text{no proteicos}}/\text{mL} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En este caso, la obtención del factor 20 corresponde a los nmol presentes en 250  $\mu\text{L}$  del desproteínizado, el cual fue diluido (por el proceso de desproteínización) 4 veces. Luego, para obtener los nmoles presentes en el plasma sanguíneo sin diluir, se multiplicó por 4 y éstos correspondieron a los nmol presentes en 200  $\mu\text{L}$  del plasma sanguíneo sin diluir. Como se deseaban obtener los nmol de  $\text{SH}_{\text{no proteicos}}/\text{mL}$  de plasma sanguíneo sin diluir, el resultado anterior se multiplicó por 5, debido a que 200  $\mu\text{L}$  es la quinta parte de 1 mL.

Para la determinación de los nmol de sulfhidrilos totales en plasma sanguíneo/mg de proteína, se dividió el valor obtenido en la Ecuación 7 para plasma sanguíneo, entre 76.37 mg/mL, como indica la Ecuación 15:

$$\frac{\text{SH}_{\text{no proteicos}} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right)}{76.37 \left( \frac{\text{mg proteína}}{\text{mL}} \right)} = \frac{\text{nmol SH}_{\text{no proteicos}}}{\text{mg proteína}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

#### 6.4.11 Determinación de proteínas por el método de Folin–Fenol (Lowry)

El método se basa en la formación de un complejo entre el  $\text{Cu}^{2+}$  y los nitrógenos de los enlaces peptídicos<sup>44</sup>.

Procedimiento: En la Tabla 20, 21 y 22, y en la Figura 31 se describen los pasos y resultados que se realizaron para la curva estándar empleada en la determinación de proteínas en plasma sanguíneo.

Tabla 20 Preparación de la muestra de plasma sanguíneo para la determinación de proteínas

Tubo	Plasma sanguíneo (µL)	H <sub>2</sub> O desionizada (µL)	Solución C* (mL)	Solución D** (µL)
Calibrar	-----	250	1.0	100
Problema	100	150	1.0	100
Estándar	100	150	1.0	100

- El plasma sanguíneo se diluyó 1:100 con agua desionizada (10µL plasma + 990µL H<sub>2</sub>O).

\* Se mezcló e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

\*\* Se mezcló e incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

- Se realizaron las lecturas a 550 nm.

Tabla 21 Preparación de la curva estándar para la determinación de proteínas

Tubo	Albúmina Sérica Bovina [3 mg/mL] (µL)	[Albúmina Sérica Bovina]	H <sub>2</sub> O* desionizada (µL)	Solución C** (mL)	Solución D (µL)
0	-----	-----	250	1.0	100
1	50	0.015	200	1.0	100
2	100	0.030	150	1.0	100
3	150	0.045	100	1.0	100
4	200	0.060	50	1.0	100
5	250	0.075	-----	1.0	100

\* Se mezcló e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

\*\* Se mezcló e incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente.

- Se realizaron las lecturas a 550nm.

Tabla 22 Valores de la curva estándar para la determinación de proteínas

[mg de proteína]	As	As'	Media
0.000	0.000	0.000	0.000
0.015	0.110	0.110	0.110
0.030	0.233	0.230	0.2315
0.045	0.352	0.349	0.3505
0.060	0.454	0.452	0.453
0.075	0.527	0.541	0.534
Σ = 0.225			Σ = 1.679
Factor = (0.225/1.679) = 0.1340			
Cálculos para plasma sanguíneo			
0.5699 (As promedio de las muestras) X 0.1340 (Factor) X 100 (F. D.) X 10 (mL) = 76.37 mg/mL			

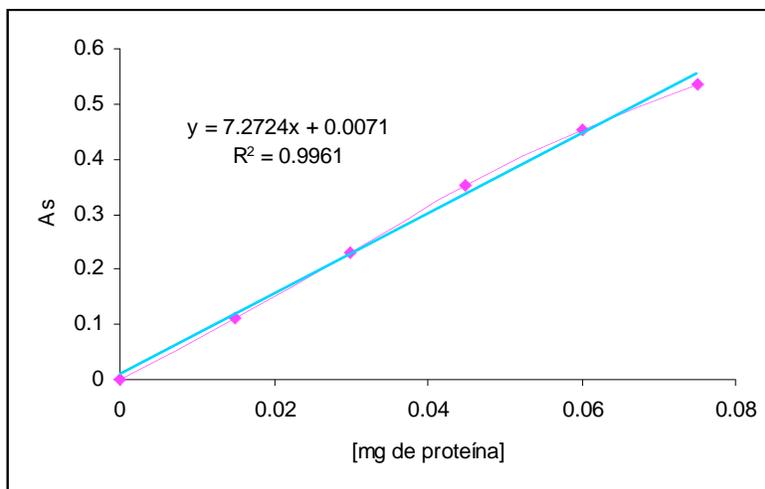


Figura 38 Curva estándar para la determinación de proteínas en plasma sanguíneo

### 6.5 Determinación de la actividad enzimática de GSNOR

El método para medir la actividad de la enzima se basa en la determinación de la oxidación del NADH a 340 nm, dependiente de GSNO (Ver Reacción 7) <sup>41</sup>.



El paquete de plaquetas se resuspendió en el volumen de lisis calculado (Ver Fórmula "b") a 4° C durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 10, 000 rpm a 4° C durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante para medir la actividad de la enzima GSNOR como se indica en la Tabla 23.

Procedimiento: En la Tabla 23 se describen los pasos que se realizaron para la determinación de la actividad de la enzima GSNOR. Se tomaron las lecturas a 340 nm y 37° C usando un espectrofotómetro BECKMAN COULTER DU<sup>®</sup> 800.

Tabla 23 Preparación de la muestra para la determinación de la actividad de la enzima GSNOR

Lisado de plaquetas	20 $\mu\text{L}$
Amortiguador (TRIS 50 mM–EDTA 0.5 mM pH 8.0)	465 $\mu\text{L}$
- Se mezcló y se ajustó a cero de absorbencia a 340 nm.	
NADH 20 mM	5 $\mu\text{L}$
GSH 50 mM	5 $\mu\text{L}$
GSNO 20 mM	5 $\mu\text{L}$
Volumen total	500 $\mu\text{L}$
- Se mezcló y se tomaron las lecturas de absorbencia a 340 nm, durante 10 minutos, cada 30 segundos.	

### Memoria de cálculo para la determinación de la actividad de GSNOR, expresada como $\text{nmol min}^{-1} 10^{-6}$ plaquetas

El coeficiente de absorción molar que se utilizó en los cálculos de la actividad enzimática fue de  $7.06 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , el cual es la suma de los coeficientes de extinciones molares del NADH ( $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y del GSNO ( $0.84 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a 340 nm (Ver Ecuación 16) <sup>37</sup>.

$$A_s = \epsilon C \quad (\text{Ecuación 16})$$

Despejando  $\epsilon$  de la Ecuación 16, tenemos la Ecuación 17:

$$\epsilon = \frac{A_s}{C} = \frac{A_s}{7.06} \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Considerando que el volumen de la mezcla de incubación fue de 0.5 mL (500  $\mu\text{L}$ ), tenemos la Ecuación 18 (Ver Figura 32):

$$\frac{\text{nmol min}^{-1}}{0.5\text{mL}} = \left( \frac{-\Delta A_s}{\text{min}} \right) \times 10^3 \quad (\text{Ecuación 18})$$

A continuación se calcula el número de plaquetas en 1 mL del lisado como indica la Ecuación 1 antes mencionada.

$$\frac{N^{\circ} \text{ plaquetas}}{mL} = \frac{(PRP - PPP) - 0.1442}{3} \times 10^9 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Posteriormente se dividió la Ecuación 1 entre el volumen de lisis ( $\mu\text{L}$ ) para obtener el número de plaquetas presentes en  $1 \mu\text{L}$ . Se multiplicó la Ecuación 1 por el valor de 20 y se obtuvo el número de plaquetas presentes en  $20 \mu\text{L}$  (Ver Ecuación 19).

$$\frac{N^{\circ} \text{ plaquetas}}{20\mu\text{L}} = \frac{\left[ \frac{(PRP - PPP) - 0.1442}{3} \times 10^9 \right]}{[(PRP - PPP) \times 500]} \times 20 \quad \text{(Ecuación 19)}$$

Para obtener los  $\text{nmol}/\text{min} \cdot 10^8$  plaquetas, se dividió la Ecuación 18 entre la Ecuación 19 y se multiplicó por 0.25, como indica la Ecuación 20:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot 10^8 \text{ plaquetas}} = \frac{\left( \frac{\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}}{500\mu\text{L}} \right)}{\left( \frac{N^{\circ} \text{ plaquetas}}{20\mu\text{L}} \right)} \times 0.25 \quad \text{(Ecuación 20)}$$

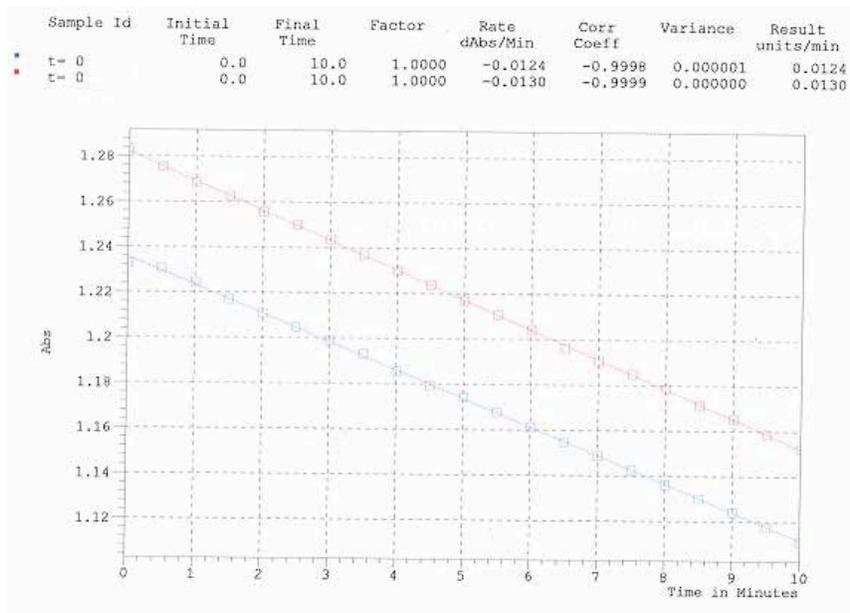
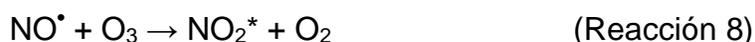


Figura 39 Actividad enzimática de GSNOR expresada en  $-\Delta\text{As}/\text{min}$

## 6.6 Determinación de ENO

Se realizó en el Analizador de Óxido Nítrico SIEVERS® Modelo NOA™ 280 i-2 DLM 14290-01 NOA Firmware Versión 3.00, Boulder, CO 80301 USA, el cual es un detector de alta sensibilidad utilizado para la medición de óxido nítrico <sup>45</sup>.

Se basa en una reacción de quimioluminiscencia en fase gaseosa entre el óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>) y el ozono (O<sub>3</sub>):



La emisión producida por el dióxido de nitrógeno excitado electrónicamente se encuentra en la región del rojo y cerca de la región del infrarrojo, y es detectada por un tubo fotomultiplicador rojo-sensitivo, enfriado termoeléctricamente.

## 6.7 Preparación de soluciones

1. Acetonitrilo absoluto: Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), P.M.=41.05, J. T. BAKER.
2. Ácido tricloroacético 20% (TCA 20%): Disolver 20 g de TCA (P.M.=163.39, MERCK) en 100 mL de agua desionizada.
3. Cisteína 250 μM (250 nmol/mL): Se disolvieron 0.015 g de cisteína (P.M.=121.16, MERCK) en 25 mL de TRIS 0.1 M pH 8.2; posteriormente se tomaron 2.5 mL de esta solución y se aforó a 50 mL con H<sub>2</sub>O desionizada.

4. DMB 5 mM: Se disolvieron 0.008 g de DMB (ácido 3, 5–dimaleimil benzoico, P.M.=312) en 5 mL de metanol absoluto; se guardó a  $-20^{\circ}$  C protegido de la luz. (El DMB fue proporcionado por Dr. José Trujillo Ferrara de la Escuela Superior de Medicina del IPN).
5. DTNB 10 mM: Se disolvieron 0.004 g de DTNB (ácido 5, 5'–ditiobis–2–nitrobenzoico, P.M.=396.35, SIGMA–ALDRICH) en 1 mL de metanol absoluto; se guardó a  $-20^{\circ}$  C protegido de la luz.
6. DTNB 0.4 mM: Se disolvieron 40  $\mu$ L de la solución de DTNB (ácido 5, 5'–ditiobis–2–nitrobenzoico, P.M.=396.35, SIGMA–ALDRICH).10 mM en 960  $\mu$ L de metanol absoluto, para obtener un volumen final de 1 mL; se guardó a  $-20^{\circ}$  C protegido de la luz.
7. Metanol absoluto: Alcohol metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), P.M.=32.02, MEYER.
8. Solución de Hepes–Tyrode–Glucosa. Composición en mM: NaCl 120,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.8, KCl 2.8,  $\text{MgSO}_4$  0.8, Hepes 20, Glucosa 5.
  - a) Glucosa (P.M.=180.16, MEYER) 100 mg
  - b)  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada 70 mL
  - c) NaCl 1.3 M (P.M.=58.44, SIGMA) 9 mL
  - d)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5 M (P.M.=141.96, MERCK) 0.16 mL
  - e) KCl 1 M (P.M.=74.55, MERCK) 0.28 mL
  - f)  $\text{MgSO}_4$  0.2 M (P.M.=246.47, MERCK) 0.4 mL
  - g) Hepes 0.5 M (P.M.=260.29, SIGMA) 4 mL

Se ajustó la solución a pH 7.4 con HCl 5 N y se aforó la solución a 100 mL con agua desionizada.

9. Sulfamato de amonio 10 mM: Se disolvieron 0.114 g de sulfamato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ , P.M.=114.12, ALDRICH) en 100 mL de agua desionizada; se guardó a temperatura ambiente protegido de la luz.
10. TRIS 0.1 M pH 8.2: Se disolvieron 12.114 g de TRIS (hidroximetil aminometano, P.M.=121.14, SPECTRUM) en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, se ajustó la solución a pH 8.2 con HCl 5 N y se aforó la solución a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada; se guardó en refrigeración a 4° C.
11. TRIS 0.4 M pH 9.5: Se disolvieron 48.456 g de TRIS (hidroximetil aminometano, P.M.=121.14, SPECTRUM) en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, se ajustó la solución a pH 9.5 con HCl 5 N y se aforó la solución a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada; se guardó en refrigeración a 4° C.
12. TRIS 50 mM–EDTA 0.5 mM–Tx 100 pH 8.0: En 500 mL de la solución de TRIS 0.1 M (hidroximetil aminometano, P.M.=121.14, SPECTRUM) se disolvieron 0.146 g de EDTA (ácido etilendiamino tetraacético, P.M.=292.24, SIGMA) y se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada hasta un volumen de 800 mL. Posteriormente se ajustó la solución a pH 8.0 con HCl 5 N y se aforó la solución a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada; para lisar las plaquetas se adicionaron 0.1 mL (100  $\mu\text{L}$ ) de Tritón X–100 (Tx 100,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$ , SIGMA) por cada 100 mL de la solución de TRIS 50 mM–EDTA 0.5 mM, si sólo se utiliza como amortiguador, no se agrega el Tx–100; se guardó en refrigeración a 4° C.
13. Soluciones utilizadas para la determinación de proteínas por el método de Folin–Fenol (Lowry).

- Solución A: Solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2% y tartrato de sodio y potasio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 0.02% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N. Se disolvieron 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , (P.M.=105.99, GOLDEN BELL), 0.10 g de  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (P.M.=282.22, FERMONT) y 2 g de NaOH en agua desionizada, se aforó la solución a 500 mL y se guardó en refrigeración a 4° C.
- Solución B: Solución de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) al 0.5% en agua desionizada. Se disolvieron 1.25 g de  $\text{CuSO}_4$  (sulfato de cobre, P.M.=159.6, FERMONT) en 100 mL de agua desionizada; se guardó a temperatura ambiente.
- Solución C: Solución cupro–alcalina. A 50 mL de la solución A se le adicionó 1 mL de la solución B. Esta solución se prepara al momento de usarse.
- Solución D: Reactivo de Folin–Ciocalteu (HYCEL DE MÉXICO, S. A. DE C. V.). Se diluyó en una proporción 1:1 en agua desionizada; se guardó a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Solución E: Solución estándar de albúmina bovina. Se pesaron 0.3 mg de albúmina bovina (SIGMA) y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada.
14. Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.8 y 7.0: Se pesaron 6.9 g de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , P.M.=137.99, QUÍMICA MEYER) y se disolvieron en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, se ajustó la solución a pH 6.8 y 7.0 respectivamente con HCl 5 N y se aforó la solución a 1 L con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada; se guardó en refrigeración a 4° C.

15. NADH 20 mM: Se pesaron 0.014 g de NADH (nicotinamín adenín dinucleótido reducido, P.M.=709.4, MERCK) y se disolvieron en 1 mL de la solución de TRIS 50 mM–EDTA 0.5 mM a pH 7.4. Se prepara al momento de usarse, debe estar protegida de la luz y se coloca sobre hielo para evitar su descomposición.
16. GSH 50 mM: Se pesaron 15.4 mg de GSH (Glutatió n Reducido, P.M.=307.3, NBC) y se disolvieron en 1 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.8. Se prepara al momento de usarse a pH ligeramente ácido, porque así se mantiene más estable; debe estar protegida de la luz y se coloca sobre hielo para evitar su oxidación.
17. Síntesis de GSNO: Se disolvieron 0.306 g (1 mmol) de GSH en 2 mL de HCl 0.625 N y se colocó sobre hielo y con agitación. Posteriormente se adicionó poco a poco y con agitación vigorosa 0.069 g (1 mmol) de  $\text{NaNO}_2$  y se dejó en agitación por 30 minutos sobre hielo. Se adicionó 5 mL de acetona fría a la mezcla y el precipitado rojo fue recuperado por filtración. Se lavó 3 veces el precipitado con 2 mL de acetona al 80%, 3 veces con acetona al 100% y 3 veces con éter etílico. El precipitado se secó al vacío a 4° C durante toda la noche y se almacenó protegido de la luz a –20° C. La pureza se estimó que fue al 98%, de acuerdo a la absorbencia a 335 nm de una solución 1 mM en HCl 0.5 N utilizando un  $\epsilon = 922 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Ver Figura 40) <sup>17</sup>.
18. GSNO 20 mM: Se pesaron 6.74 mg de GSNO (S–nitrosoglutatió n, P.M.=337) y se disolvieron en 1 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.8. Se prepara al momento de usarse a pH ligeramente ácido, porque así se mantiene más estable; debe estar protegida de la luz y se coloca sobre hielo para evitar su descomposición.

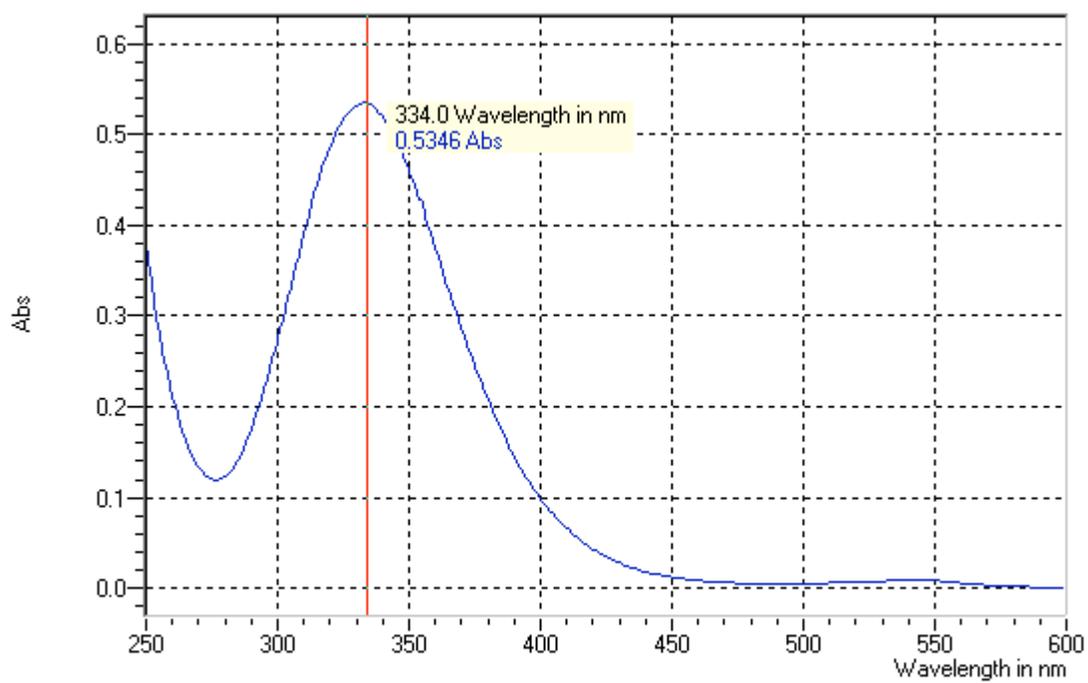


Figura 40 Espectro de absorción del S-nitrosoglutatión (GSNO)

## 7. Bibliografía

1. Abbas A, Lichtman A. Inmunología celular y molecular. 5ª ed. España: Saunders–Elsevier; 2004. p. 448–52.
2. Andreadis A, Hazen S, Comhair S, Erzurum S. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003;35:213–25.
3. Aw T, Ookhtens M, Kaplowitz N. Inhibition of glutathione efflux from isolated rat hepatocytes by methionine. *J Biol Chem* 1984;259:9355–8.
4. Bateman E, Jithoo A. Asthma and allergy—a global perspective. *Allergy* 2007;62:213–5.
5. Beasley R, Roche W, Roberts J, Holgate S. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:806–17.
6. Bell S, Shah C, Gordge M. Protein disulfide–isomerase mediates delivery of nitric oxide redox derivatives into platelets. *Biochem J* 2007;403:283–8.
7. Carey F. Química orgánica. 6ª ed. México: Mc Graw–Hill Interamericana. 2006. p. 632–72.
8. Chen K, Detwiler T, Essex D. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Brit J Haematol* 1995;90:425–31.
9. Consenso Mexicano de Asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2005;64:S7–44.

10. Cruz A. Mecanismos hemostáticos. En: Ruiz G, editor. Fundamentos de hematología. 10<sup>a</sup> ed. México: Médica Panamericana, S. A. de C. V.; 2003. p. 342–76.
11. Essex D, Chen K, Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood* 1995;86:2168–73.
12. Essex D, Li M. A polyclonal antibody to protein disulfide isomerase induces platelet aggregation and secretion. *Thromb Res* 1999;96:445–50.
13. Essex D, Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Brit J Haematol* 1999;104:448–54.
14. Essex D, Li M, Miller A, Feinman R. Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochem* 2001;40:6070–5.
15. Fang K, Johns R, Macdonald T, Kinter M, Gaston B. S-nitrosoglutathione breakdown prevents airway smooth muscle relaxation in the guinea pig. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;23:L716–21.
16. Fernández M, Galindo J, Salas J. Asma. En: Cano F, Baltazares E, Ibarra C, editor. Enfermedades del aparato respiratorio. 1<sup>a</sup> ed. México: Méndez Editores, S. A. de C. V.; 2008. p. 185–209.
17. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 1999;13:2002–14.

18. Fundación UNED 2008. Trabajos 2007–2008. [En línea] [Consultada Feb., 2008] Disponible en: [[http://sameens.dia.uned.es/Trabajos/S1-7a/AMartinez/trabajo\\_1/Diapositiva1.GIF](http://sameens.dia.uned.es/Trabajos/S1-7a/AMartinez/trabajo_1/Diapositiva1.GIF)]
19. Ganong W. Fisiología médica. 18ª ed. México: Manual Moderno S. A. de C. V.; 2002. p. 705–24.
20. Gaston B, Carver J, Doctor A, Palmer L. S–nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Inter* 2003;3:253–63.
21. Gaston B, Sears S, Woods J, Hunt J, Ponaman M, McMahon T, Stamler J. Bronchodilator S–nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998;351:1317–19.
22. Gaston B, Singel D, Doctor A, Stamler J. S–nitrosothiol signaling in respiratory biology. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1186–93.
23. Ghibelli L, Fanelli C, Rotillo G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, Civitareale P, Ciriolo M. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 1998;12:479–86.
24. GINA. The Global Initiative for Asthma Estrategia Global para el Manejo y la Prevención del Asma 2005. [En línea] [Consultada Feb., 2008]. Disponible en línea: [<http://www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp??l1=2&l2=1&intId=1244>]
25. Girard P, Potier P. NO, thiols and disulfides. *FEBS* 1993;320:7–8.
26. Gresele P, Dottorini M, Selli M, Iannacci L, Canino S, Todisco T, Romano S, Crook P, Page C, Nenci G. Altered platelet function associated with the bronchial hyperresponsiveness accompanying nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:894–902.

27. Griffith O. The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine. *J Biol Chem* 1981;256:12263–8.
28. Grupo ISAAC España. Objetivo y métodos del estudio ISAAC (Internacional Study of Asthma and Allergy in Childhood) 2008. Disponible en: [<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol20/n1/salu1a.html>]
29. Guzmán A, Hicks J. Óxido nítrico. En: Hicks J, editor. *Bioquímica*. 2<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw–Hill Interamericana Editores S. A. de C. V.; 2007. p. 676–88.
30. Guzmán A, Noriega I, Mendoza R, Hicks J. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: Participación en las enfermedades respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2005;18:240–6.
31. Habeeb A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Meth Enzymol* 1972;25:457–9.
32. Haqqani A, Do S, Birnboim H. The role of a formaldehyde dehydrogenase–glutathione pathway in protein S–nitrosation in mammalian cells. *Nitric Oxide* 2003;9:172–81.
33. Hedberg J, Griffiths W, Nilsson S, Höög J. Reduction of S–nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur J Biochem* 2003;270:1249–56.
34. Hess D, Matsumoto A, Kim S, Marshall H, Stamler J. Protein S–nitrosylation: Purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:150–66.
35. Hicks J, Sierra P, Olivares I, Torres J, Guzmán A. Estrés oxidante en asma. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2005;18:70–8.

36. Hotchkiss K, Matthias L, Hogg P. (1998). Exposure of the cryptic Arg–Gly–Asp sequence in thrombospondin–1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1998;1388:478–88.
37. Jensen D, Belka G, Du Bois G. S–nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J* 1998;331:659–68.
38. Kowaluk E, Fung H. Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S–nitrosothiols. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:1256–64.
39. Lahav J, Winjnen E, Hess O, Hamaia S, Griffiths D, Makris M, Knight C, Essex D, Farndale R. Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin  $\alpha_2\beta_1$ . *Blood* 2003;102:2085–92.
40. Lieberman M, Wiseman A, Shi Z, Carter B, Barrios R, Ou C, Chévez P, Wang Y, Habib G, Goodman J, Huang S, Lebovitz R, Matzuk M. Growth retardation and cysteine deficiency in  $\gamma$ –glutamyl transpeptidase–deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7923–6.
41. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler J. Metabolic enzyme for S–nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001;410:490–4.
42. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes M, Ahearn G, McMahon T, Dickfeld T, Marshall H, Que L, Stamler J. Essential roles of S–nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 2004;116:617–28.
43. López E. Asma bronquial I: Epidemiología, patogenia, definición, 2007. Medwave Enero Año VII No 1. Disponible en: [<http://www.medwave.cl/atencion/adultos/hospclinicouchile2006/4/1.act>]

44. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
45. Manual de operación y mantenimiento del analizador de óxido nítrico SIEVERS®. 1995–2000. Modelo NOA™ 280 i–2 DLM 14290–01 NOA Firmware Versión 3.00, Boulder, CO 80301 USA. p. 1.
46. Martin J, Slater D, Trowbridge E. Abnormal intrapulmonary platelet production: A possible cause of vascular and lung disease. *Lancet* 1983;793–6.
47. Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma–glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans* 1983;11:793–4.
48. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263:17205–8.
49. Meister A. Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Meth Enzimol* 1995;252:26–30.
50. Meister A. Glutathione metabolism. *Meth Enzymol* 1995;251: 3–7.
51. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271: 35–42.
52. Meister A, Anderson M. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983;52:711–60.
53. Metzger W, Sjoerdsma K, Richerson H, Moseley P, Zavala D, Monick M, Hunninghake G. Platelets in bronchoalveolar lavage from asthmatic patients and allergic rabbits with allergen–induced late phase responses. *Agents Actions Suppl* 1987;21:151–9.

54. Miller J. Plaquetas en sangre. En: Henry J, editor. El laboratorio en el diagnóstico clínico. 20<sup>a</sup> ed. Vol. 1. España: Marbán Libros, S. L.; 2005. p. 623–41.
55. Nadeem A, Chhabra S, Masood A, Raj H. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:72–8.
56. Noiva R, Lennarz W. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992;267:3553–6.
57. Olivares I, Guzmán A, Medina R, Hicks J. Especies reactivas del oxígeno (ERO): Bioquímica inorgánica y biomedicina. En: Hicks J, editor. Bioquímica. 2<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw–Hill Interamericana Editores S. A. de C. V.; 2007. p. 689–708.
58. Pepper I. Atlas de inmunología. Universidad de Chile. [En línea] [Consultada Feb., 2008]. Disponible en línea: [[www.med.uchile.cl/sitios\\_int/atlas/38.htm](http://www.med.uchile.cl/sitios_int/atlas/38.htm)]
59. Picó M, Ruiz M, Picó T, García M. El papel del músculo liso bronquial y los nervios en la fisiopatología del asma bronquial. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2001;17:81–90.
60. Que L, Liu L, Yan Y, Whitehead G, Gavett S, Schwartz D, Stamler J. Protection from experimental asthma by an endogenous bronchodilator. *Science* 2005;308:1618–21.
61. Radomski M, Rees D, Dutra A, Moncada S. S–nitroso–glutathione inhibits platelet activation *in vitro* and *in vivo*. *J Pharmacol* 1992;107:745–9.

62. Ramachandran N, Root P, Jiang X, Hogg P, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9539–44.
63. Regalado J, Vargas M. Epidemiología del asma. En: Salas J, Chapela R, Vargas M, editor. *Asma: Enfoque integral para Latinoamérica*. 1ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.; 2005. p. 1–26.
64. Ricciardolo F, Sterk P, Gaston B., Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004;84:731–65.
65. Roitt I, Delves P. *Inmunología, fundamentos*. 10ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2003. p. 372–5.
66. Root P, Sliskovic I, Mutus B. Platelet cell-surface protein disulphide-isomerase mediated S-nitrosoglutathione consumption. *Biochem J* 2004;382:575–80.
67. Salas J, Cano F. Asma. En: Cano F, Ibarra C, Morales J, editor. *Enfermedades respiratorias. Temas selectos*. 1ª ed. España: Elsevier; 2006. p. 253–70.
68. Salazar M. Anatomía patológica del asma. En: Salas J, Chapela R, Vargas M, editor. *Asma: Enfoque integral para Latinoamérica*. 1ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.; 2005. p. 79–92.
69. Sandford A, Joos L, Paré P. Genética del asma. En: Salas J, Chapela R, Vargas M, editor. *Asma: Enfoque integral para Latinoamérica*. 1ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.; 2005. p. 47–78.

70. Sanghani P, Stone C, Ray B, Pindel E, Hurley T, Bosron W. Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochem* 2000;39:10720–9.
71. Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of tilos. *Analyst* 1958;83:670–2.
72. Sengupta R, Ryter S, Zuckerbraun B, Tzeng E, Billiar T, Stoyanovsky D. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochem* 2007;46:8472–83.
73. Sierra P, Guzmán A, Olivares I, Torres J, Hicks J. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:135–48.
74. Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 2005;280:8733–41.
75. Sociedad Catalana de Cardiología. Fisiopatología del síndrome coronario agudo: Del trombo a la expresión molecular. *Rev Soc Catalana Cardiol* 2002;4:146–55. [En línea] [Consultada Feb., 2008]. Disponible en línea: [www.academia.cat/societats/cardio/43puntf2.jpg](http://www.academia.cat/societats/cardio/43puntf2.jpg)
76. Stamler J, Fang F, Lamas S. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001;106: 675–83.
77. Stamler J, Simon D, Osborne J, Mullins M, Jaraki O, Michel T, Singel D, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:444–8.

78. Stoyanovsky D, Tyurina Y, Tyurin V, Anand D, Mandavia D, Gius D, Ivanova J, Pitt B, Billiar T, Kagan V. Thioredoxin and lipoic acid catalyze the denitrosation of low molecular weight and protein S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc* 2005;127:15815–23.
79. Tate S, Meister A.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in *Hydra littoralis*. *Biochem Biophys Res Comm* 1976;70:500–5.
80. Tattersfield A, Knox A, Britton J, Hall I. Asthma. *Lancet* 2002;360:1313–22.
81. Udem B, Lichtenstein L. Drugs used in the treatment of asthma. In: Goodman L, Gilman A. Goodman & Gilman's The pharmacological basic of therapeutics. 10<sup>a</sup> ed. USA: McGraw-Hill; 2001. p. 733–54.
82. Upchurch G, Welch G, Loscalzo J. S-nitrosothiols: Chemistry, biochemistry, and biological actions. *Adv Pharmacol* 1995;34:343–9.
83. Voet D, Voet J. (2004). *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. USA: John Wiley & Sons, INC.; 2004. p. 776–1027.
84. Ward J, Belvisi M, Fox A, Miura M, Tadjkarimi S, Yacoub M, Barnes P. Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal peptide in human always in vitro. *J Clin Invest* 1993;92:736–42.
85. Weyrich A, Lindemann S, Zimmerman G. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost* 2003;1:1897–1905.
86. Wink D, Cook J, Kim Y, Vodovotz Y, Pacelli R, Krishna C, Russo A, Mitchell B, Jour'dheuil D, Miles M, Grisham B. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. *J Biol Chem* 1997;272:11147–51.

- 87.** Zai A, Rudd M, Ward A, Loscalzo J. Cell–surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Chem Invest* 1999;103:393–9.
  
- 88.** Zhang Y, Hogg N. The mechanism of transmembrane S–nitrosothiol transport. *Proc Natl Acad Soc* 2004;101:7891–6.