



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EXOCRINOPATÍA
ESPONTÁNEA DESARROLLADA EN EL RATÓN CD1 et / et**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FROYLAN DEL CASTILLO ZUÑIGA

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: M. C. MAURILIO FLORES PIMENTEL



México D. F.

Septiembre

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios por todo.

A la UNAM por darme la oportunidad de ser parte de sus alumnos.

A la FES Zaragoza por su labor social, cultural, deportiva y de salud.

A mi familia mi máxima inspiración que siempre tiene un comentario o ejemplo de superación; Sra. Basilia, Sr. José, Abel, Abelito, Alba, Bricia, Daniel, Dulce Diana, Frida, Fridita, Gianelly, Irais, José Luís, Kael, Libia, Noel, Noelito, Omar, Said, Salvador, Silvia, Thialy,

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por sus conocimientos y paciencia.

Al M. C. Maurilio Flores Pimentel por sus conocimientos.

A mis sinodales por su paciencia, apoyo, tiempo y sugerencias:

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Q. F. B. Luz Margarita Chávez Martínez

M. en C. Raquel Retana Ugalde

A los profesores del laboratorio de inmunología L-1 de la FES-Zaragoza campus-II de la UNAM, por sus conocimientos, apoyo y amistad:

Mtra. Yolanda Flores Cabrera, M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

M. en O. Enrique Pérez Guarneros.

A mis compañeros del laboratorio de inmunología L-1 por su amistad:

Alejandra, Blanca, Brenda, Elisa, Guadalupe, Hilda, Adrián, Erick, Francisco, Geovany.

A mis amistades por los buenos momentos en la UNAM-FES-Zaragoza:

Susana ☺☀☽♣, Rosalba ♦, Lizeth Ψ, Elizabeth ☆, Maga ♪, Ariadna ♪, Adriana ♪, Maritza ♪, Chuy √, Brenda ♪, Isaura ♣*, Karina ♣*, Erika ☺, Angélica ♠, Mónica ♪, verónica ✓, América ✓, Hayde ✓, Alfredo √, Antonio ✓, Dalila 📞, Gaby ♠, Rosa 📖, Mauricio ✍, Octavio 📖, Marco ♪, Mabel ♪, Oscar ♪, etc. ∞∞

DEDICADO A

A Sra. Basilia Zúñiga Gutiérrez y Sr. José del Castillo Blanco por ser mis padres bien padres, mi ejemplo de todo lo bueno, mis maestros de toda la vida.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1 LESIÓN CELULAR | 4 |
| 3.2 ESTRÉS OXIDATIVO | 9 |
| 3.3 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS | 11 |
| 3.4 CITOTOXICIDAD DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO | 15 |
| 3.5 DEFENSAS CELULARES FRENTE A LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO | 19 |
| 3.6 SISTEMAS DE DEFENSA PRIMARIOS | 20 |
| 3.7 SISTEMAS DE DEFENSA SECUNDARIOS | 25 |
| 3.8 UTILIDAD DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA PREVENCIÓN DE LOS PROCESOS PATOLÓGICOS MEDIADOS POR LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO | 29 |
| 3.9 MODELO ANIMAL | 32 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 33 |
| 5. HIPÓTESIS | 34 |
| 6. OBJETIVOS | 35 |
| 7. DISEÑO EXPERIMENTAL | 36 |
| 8. MATERIAL | 38 |
| 8.1 MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO | 38 |
| 8.2 MATERIAL BIOLÓGICO | 41 |
| 9. METODOS | 42 |
| 9.1 OBTENCIÓN DE SANGRE, INSPECCION DE OJOS, EXTRACCIÓN Y PESO DE GLANDULAS | 42 |
| 9.2 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PEROXIDACIÓN LIPIDICA | 43 |
| 9.3 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE SUPEROXIDO DISMUTASA | 45 |
| 9.4 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE NITRITOS | 47 |
| 9.5 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE CERULOPLASMINA | 49 |
| 9.6 PREPARACIÓN Y ANALISIS DE NBT | 50 |
| 10. DIAGRAMA DE FLUJO | 52 |
| 11. RESULTADOS | 53 |
| 12. DISCUSIÓN Y ANALISIS | 60 |
| 13. CONCLUSIÓN | 64 |
| 14. PROPUESTAS | 65 |
| 15. REFERENCIAS | 66 |
| 16. ANEXO | 68 |

1. RESUMEN

El estrés oxidativo en la enfermedad como respuesta inmunitaria, utiliza con amplitud muchas de las moléculas oxidativas estudiadas aquí, es claro que este sistema de defensa es una espada de dos filos que también incrementa el riesgo oxidativo para su huésped, el objetivo de este estudio fue evaluar la participación del estrés oxidativo en la exocrinopatía espontánea que muestra el ratón *et / et*, para lo cual se usaron 71 ratones de las cepas *et / et*, *et / +* y *+ / +*, de los cuales los *et / et* desarrolla espontáneamente síntomas que semejan al Síndrome de Sjögren (SS) que es un cuadro autoinmune caracterizado por destrucción de glándulas tanto salivales como lagrimales, y como consecuencia sequedad ocular y bucal, causándole al ratón destrucción de las glándulas lagrimales, que en nuestro estudio se pudo demostrar como un peso relativo de estas glándulas menor en los ratones *et / et*, además los resultados mostraron que los índices de las glándulas submaxilares y el bazo son mayores en los ratones *et / et* lo que nos indicaría una inflamación, el estudio se completo con análisis en plasma de la enzima superóxido dismutasa, peroxidación lipídica, proteína ceruloplasmina, nitritos y NBT, que demostraron diferencia al ocupar ANOVA simple con una confianza al 95 % y una α al 0.05, lo cual nos indico que algunos factores del estrés oxidativo son mayores en ratones *et / et* que en *+ / +*, por lo que se cree el estrés oxidativo si tiene una participación en la exocrinopatía espontánea.

PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EXOCRINOPATIA ESPONTANEA DESARROLLADO EN EL RATON CD1 et / et.

2. INTRODUCCIÓN:

La función del estrés oxidativo en la enfermedad es un tema que despertó gran interés en años recientes, pues se observó que la respuesta inmunitaria utiliza con amplitud muchas de las moléculas oxidativas estudiadas aquí para generar anión superóxido y óxido nítrico como parte integral de la respuesta a materiales extraños¹. Es claro que este sistema de defensa es una espada de dos filos que también incrementa el riesgo oxidativo para su huésped⁵, como los radicales que se entienden como cualquier átomo que contiene uno o más electrones orbitales no apareados en su estado de rotación, el radical puede ser una molécula muy pequeña como oxígeno u óxido nítrico, o parte de una biomolécula grande como una proteína, carbohidrato, lípido o ácido nucleico. Algunas especies radicales son muy reactivas con otras biomoléculas y otras, como el oxígeno triatómico normal, son hasta cierto punto inertes.

Es necesario en este trabajo hablar acerca de lesión celular (3.1) ya que entre los mecanismos bioquímicos que contribuyen a esta lesión, están las especies reactivas de oxígeno, un sin número de estudios científicos implica a el estrés oxidativo (3.2) en las enfermedades inflamatorias, desde su producción (3.3) hasta su citotoxicidad (3.4) sin embargo, las células poseen múltiples mecanismos protectores (3.5) contra el estrés oxidativo que pueden prevenir el daño celular según su grado de eficacia, pueden ser primarios (3.6) o secundarios (3.7) y como en este estudio nos interesa saber si, en el daño ocular observado en los ratones causado por la exocrinopatía espontánea, se ve afectado o en desequilibrio los sistemas prooxidantes / antioxidantes, se sabe que cuando ocurren procesos oxidativos adicionales, los sistemas prooxidantes pueden desequilibrar los antioxidantes y como resultado causar daño oxidativo a los tejidos, y es entonces cuando se hace necesario hablar de la utilidad de los antioxidantes en la prevención (3.8) de los procesos patológicos mediados por las especies reactivas de oxígeno.

Los ratones utilizados ^(3.9) en este estudio fueron ratones de las cepas + / +, et / + y et / et que son los que presentan espontáneamente uveorretinitis espontánea crónica a anticuerpos contra antígenos S de la retina, ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido hipotimia, periodo de vida corta, factores que se cree lo hacen y lo exponen a tener mayor estrés oxidativo y como se sabe cuando ocurren procesos oxidativos adicionales, los sistemas prooxidantes pueden desequilibrar los antioxidantes y como resultado causa más daño oxidativo en, lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que en último termino después del daño celular, inflamación y posteriormente conduce a la muerte celular en el estrés oxidativo grave en comparación de los ratones bien adaptados a la vida y sin exocrinopatía espontánea como lo es el ratón con pelo + / + ⁸, para comparar el estrés oxidativo en estos ratones, primero se realizó una inspección de los ojos en cada uno de los ratones, extracción de las glándulas, submaxilares, lagrimales y obtención de sangre ^(9.1), además se determino la peroxidación lipídica ^(9.2), superóxido dismutasa ^(9.3), nitritos ^(9.4), ceruloplasmina ^(9.5) y NBT ^(9.6), de los cuales se desprendieron resultados ⁽¹¹⁾ que nos indican que existen diferencias al hacer el análisis y discusión ⁽¹²⁾, de los cuales concluimos ⁽¹³⁾ que el estrés oxidativo si tiene una participación en la exocrinopatía espontánea desarrollada en los ratones et / et, como punto final damos propuestas ⁽¹⁴⁾ que creemos son útiles en el análisis del estrés oxidativo en estos ratones.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LESION CELULAR.

Cuando hay cambios en la célula, la adaptación celular fisiológica y morfológica que captan el estado nuevo pero claramente alterado, ayudan a preservar la viabilidad de la célula y modulan su función en respuesta a tales estímulos, y la lesión celular ocurre si se exceden los límites de la respuesta adaptativa a un estímulo, o en ciertas circunstancias en las que la adaptación no es posible.

Si la respuesta adaptativa ayuda a la célula y le permite sobrevivir a un nivel de actividad elevado se dice que la célula se adapta y hay hipertrofia, pero si no hay una respuesta adaptativa que le permita sobrevivir a un nivel de actividad elevada en la que existe una reducción en el tamaño y función de las células se dice entonces que hay atrofia.

Como resultado final de la lesión celular, acontecimiento más importante en la anatomía patológica que afecta a cualquier tipo celular es la muerte celular, que puede ser por estímulos exógenos (necrosis) o también producirse cuando una célula muere tras la activación de un programa interno de suicidio (apoptosis) que sus principales características morfológicas son la condensación y fragmentación de la cromatina ^{1,2,3}.

CAUSAS DE LESION CELULAR.

Los cuatro aspectos de un proceso patológico que forman el núcleo de la anatomía patológica o patología son:

1. Su causa (etiología) factores etiológicos:
 - Intrínsecos o genéticos.
 - Adquiridos (infecciosos
Nutricionales, químicos, físicos)
2. Los mecanismos de su desarrollo (Patogénia).
3. Las alteraciones estructurales inducidas en las células y órganos del cuerpo (cambios morfológicos)
 1. Las consecuencias funcionales de los cambios morfológicos (significado clínico)

Adaptación \Rightarrow Lesión reversible \Rightarrow Lesión irreversible \Rightarrow Muerte celular.

Causas de lesión celular:

- Privación de oxígeno (hipoxia)
- Agentes físicos (quemaduras y frío intenso)
- Agentes químicos y fármacos.
- Agentes infecciosos.
- Reacciones inmunológicas.
- Trastornos genéticos.
- Desequilibrios nutricionales.

Principios que son relevantes para la mayor parte de la lesión celular

- La respuesta celular frente a estímulos nocivos depende del tipo de lesión, su duración y su gravedad.
- Las consecuencias de la lesión celular dependen del tipo, estado y capacidad de adaptación de la célula lesionada.
- Para determinar el lugar bioquímico preciso sobre el que actúa un agente lesivo, cuatro sistemas intracelulares son particularmente vulnerables:
 1. El mantenimiento de la integridad de las membranas celulares.
 2. La respiración aerobia.
 3. La síntesis de proteínas.
 4. La preservación de la integridad del aparato genético de la célula.
- Los elementos estructurales y bioquímicos de la célula están tan estrechamente interrelacionados que, cualquiera que sea el punto preciso del ataque inicial, la lesión de un locus da lugar a una amplia gama de efectos secundarios.
- Los cambios morfológicos de la lesión celular se hacen evidentes sólo después de que se alteran algunos de los sistemas bioquímicos críticos del interior de la célula^{1,3}.

Aspectos bioquímicos comunes que parecen ser importantes en la medición de la lesión celular y la muerte celular por necrosis.

- Agotamiento de ATP.
- Oxígeno y radicales libres derivados de oxígeno.
- Calcio intracelular y pérdida de la homeostasis del calcio.
- Defectos de la permeabilidad de la membrana.
- Lesión mitocondrial irreversible.

Tres formas frecuentes de lesión celular.

1. Lesión isquémica o hipóxica.
2. Lesión inducida por radicales libres, incluyendo las especies de oxígeno activado.
3. Algunos tipos de lesión toxica.

Lesión isquémica e hipoxia: {
- Lesión celular reversible.
- Lesión celular irreversible.

Lesión celular inducida por radicales libres.

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón no emparejado en una orbita externa. En ese estado, el radical es extremadamente reactivo e inestable y entra en reacción con sustancias químicas inorgánicas u orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos), en especial con moléculas clave de las membranas y con ácidos nucleicos. Además, los radicales libres inician reacciones auto catalíticas, por lo que las moléculas con las que reaccionan se convierten ellas mismas en radicales libres para propagar la cadena de lesión^{1,5,7}.

Los radicales libres se pueden iniciar en la célula mediante^{1,4,6,7}.

- Absorción de energía radiante (luz UV, rayos X). Por ejemplo, la radiación ionizante puede hidrolizar el agua en radicales libres hidroxilo (OH^\bullet) e hidrogeno (H^\bullet)
- Metabolismo enzimático de productos químicos o fármacos exógenos (tetracloruro de carbono (CCl_4) puede generar (CCl_3^\bullet).
- Las reacciones reducción – oxidación que se producen durante los procesos metabólicos normales. En este proceso, se producen pequeñas cantidades de productos intermedios tóxicos; entre ellos se incluyen el radical anión súper óxido (O_2^\bullet), el peroxido de hidrogeno (H_2O_2) y los iones hidroxilo (OH^\bullet)
- Los metales de transición como el hierro y el cobre donan o aceptan electrones libres durante las reacciones intracelulares y catalizan la formación de radicales libres, como ocurre en la reacción de Fenton:
$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet$$
- El óxido nítrico (NO)¹⁶, un mediador químico importante generado por células endoteliales, macrófagos, neuronas y otros tipos celulares, puede actuar como un radical libre y también puede ser convertido en la forma intensamente reactiva de anión peroxinitrito (ONOO^-), así como en NO_2^\bullet y en NO_3^- .

Los reactantes de oxígeno se producen como consecuencia inevitable de la vida aeróbica.

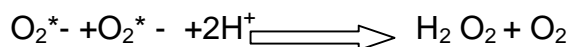
3.2 ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo ha sido implicado en el envejecimiento^{1,2,3} y en la patogénesis de una gran variedad de padecimientos. La extensión del daño se relaciona generalmente de un aumento o disminución de una o más de las enzimas depuradoras de radicales libres, como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa etc., estas enzimas se han identificado en glóbulos rojos, fluidos extracelulares como plasma, suero, líquido cefalorraquídeo y sobrenadantes de células cultivadas, en la actualidad las enzimas antioxidantes se han evaluado en arteriosclerosis en daño isquémico / reperfusión de corazón, cerebro, retina y mucosa gastrointestinal, enfermedades hemolíticas, estrés, enfisema respiratorio, diabetes¹⁰, artritis, falla renal, infección pancreática etc⁴.

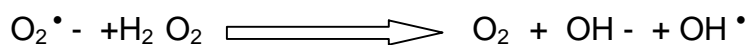
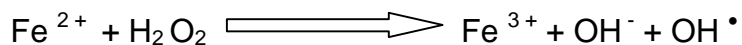
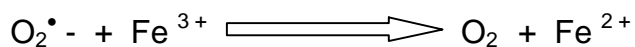
NATURALEZA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas y, por tanto, tienen una semivida corta y una concentración en situación estacionaria baja.

Cuando un electrón reduce la molécula de oxígeno, se produce el ión radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Esta especie química es muy reactiva. El $O_2^{\bullet -}$ es muy inestable en soluciones acuosas, y reacciona consigo mismo para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) mediante una reacción de dismutación:



La forma protonada del radical superóxido es el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet). Son dos los electrones que se incorporan a la molécula de oxígeno, se forma el ion peroxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peroxido de hidrógeno. Este compuesto es peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y porque, a partir de él, se puede originar el radical hidroxilo (HO^\bullet). El radical hidroxilo se origina por la reducción del oxígeno molecular por tres electrones. Esta especie química es una de las mas reactivas que se conocen, y posee una semivida y un radio de acción muy cortos. Una fuente importante de radicales hidroxilo es la reacción de Haber – Weiss que es, a su vez, el balance de dos reacciones, la segunda de las cuales es la de Fenton. Finalmente, la reducción tetravalente del oxígeno molecular con cuatro protones origina dos moléculas de agua.



3.3 PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs) EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Las especies reactivas de oxígeno se están produciendo continuamente en los sistemas biológicos, sin embargo, cuando hay una hiperproducción de estos radicales libres, o bien cuando los sistemas de defensa antioxidante están deteriorados, estas especies tan reactivas provocan graves daños celulares. Los principales sistemas biológicos capaces de producir especies reactivas de oxígeno son^{6,7}:

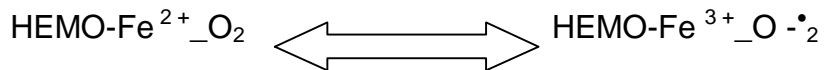
- Autooxidación de pequeñas moléculas,
- Oxidación de la hemoglobina y la mioglobina.
- Actividad de enzimas.
- Peroxisomas.
- Transporte electrónico mitocondrial.
- Transporte activo microsomal.
- Fuentes exógenas.

Autooxidación de pequeñas moléculas.

Diferentes moléculas citoplasmáticas pueden producir EROs cuando se autooxidan. En todos los casos, se produce como radical primario el $O_2 \cdot$ - que, por una reacción de dismutación espontánea o enzimática, puede dar lugar a $H_2 O_2$. Cuando esas moléculas oxidadas se vuelven a reducir, se establece un ciclo redox que puede implicar un consumo desproporcionado de oxígeno molecular y equivalentes redox. Entre estas moléculas se encuentran iones divalentes, tioles, quinonas, catecolaminas, tetrahydropterinas y flavinas.

Oxidación de la hemoglobina y la mioglobina.

La oxidación de estas hemoproteínas puede producir radicales libres de oxígeno. El hierro de la hemoglobina y de la mioglobina, cuando liga O_2 , está normalmente en la forma ferrosa, pero existe una cierta deslocalización electrónica, de manera que se produce el equilibrio siguiente:



Es posible que la molécula de hemoglobina oxigenada se descomponga y dé lugar a $O_2^{\bullet -}$ y hemo-Fe³⁺. En ese punto, la hemoglobina, ya metahemoglobina, no puede transportar oxígeno. Normalmente, sólo una baja proporción de oxihemoglobina es transformada en metahemoglobina debido a la acción de las metahemoglobinas reductasas.

Actividad de enzimas.

Diversas enzimas generan EROs durante sus ciclos catalíticos. Entre ellas se encuentran la dihidrotato deshidrogenasa, la triptófano dioxigenasa, la aldehído oxidasa, la monoaminooxidasa, la xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la NADPH oxidasa. En algunos casos, los radicales libres que se forman inactivan las enzimas que las originan y, de esta forma, regulan la ruta metabólica en la que participan.

Peroxisomas

Se ha comprobado que los compuestos que estimulan la proliferación de los peroxisomas inducen el estrés oxidativo. Estos orgánulos tienen una gran capacidad para producir H_2O_2 debido a la elevada concentración de oxidasas que contienen. Algunos ejemplos son: las L- y D-aminoácido oxidasas, la glicolato oxidasa o la urato oxidasa. Estas enzimas catalizan la reducción divalente del O_2 sin formación del radical superóxido. La oxidación peroxisómica de ácidos grasos también genera H_2O_2 como subproducto^{6,7}.

Transporte electrónico mitocondrial.

El sistema de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente de $O_2^{\bullet -}$. La citocromo oxidasa cataliza la reducción del oxígeno molecular con cuatro electrones y cuatro protones para dar dos moléculas de agua^{4,6}. El diseño molecular de este complejo proteico impide la liberación de EROs. Sin embargo, cuando la cadena respiratoria está muy reducida y la concentración de ADP es limitante, otros componentes de la cadena respiratoria sí pueden perder electrones durante su transferencia y generar $O_2^{\bullet -}$. La formación de radicales libres de oxígeno durante el transporte electrónico mitocondrial se ve favorecida por elevadas concentraciones de O_2 .

Transporte electrónico microsomal.

Las fracciones microsomales liberan $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 cuando se incuban con NADPH. El denominado citocromo P_{450} es, en realidad, un conjunto de citocromos localizados en el retículo endoplásmico y otros organelos. Estos citocromos están implicados en la oxidación de sustratos a expensas de O_2 , uno de cuyos átomos se une al sustrato y la otra forma agua. En la reacción se requiere poder reductor que normalmente es aportado por el NADPH a través de una flavoproteína denominada NADPH – citocromo P_{450} reductasa. Cuando se desacopla el ciclo catalítico del P_{450} el flujo de electrones se desvía al O_2 , que se convierte en $O_2^{\bullet -}$ en lugar de unirse al sustrato. La autooxidación de la NADPH – citocromo P_{450} reductasa también puede originar $O_2^{\bullet -}$.

El citocromo b_5 , es una hemoproteína del sistema de transporte electrónico microsomal responsable de la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos. Los electrones se transfieren desde el NADH o NADPH al citocromo b_5 , por una flavoproteína reductasa y el citocromo b_5 , a su vez, los cede a la desaturasa. Finalmente, esta proteína oxida al ácido graso con O_2 y forma agua. Por causas desconocidas, es posible que el citocromo b_5 y la flavoproteína cedan electrones al O_2 y generen $O_2^{\bullet -}$.

Fuentes exógenas.

Además de los sistemas intracelulares descritos anteriormente, existen fuentes exógenas de EROs. La radiación ionizante, la radiación ultravioleta o la luz visible en presencia de fotosensibilizadores pueden dar lugar a radicales libres. La formación de radicales libres también está implicada en la toxicidad de una amplia variedad de xenobióticos. Realmente, muchos de estos compuestos químicos ejercen su acción tóxica mediante su activación metabólica a productos intermedios reactivos que son radicales libres. Entre estos compuestos se encuentran diversos pesticidas, el humo del tabaco, antimicrobianos, fármacos anticancerígenos y otros medicamentos^{5,6,7}.

3.4 CITOTOXICIDAD DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La mayor parte de los componentes celulares puede ser dañada por las EROs, pero las proteínas, los ácidos grasos insaturados, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono resultan ser los blancos fundamentales de las reacciones de estas especies. Cuando los radicales libres de oxígeno reaccionan con esas moléculas, la estructura de las mismas se altera y, como consecuencia de ello, también el correcto funcionamiento de la célula^{5,6}.

Los daños pueden ser a:

- Proteínas.
- Lípidos.
- Ácidos nucleicos.
- Hidratos de carbono.

Proteínas.

Las proteínas pueden ser dañadas por los EROs de varias formas.

Como por ejemplo el estado redox de los ligandos metálicos de muchas metaloproteínas puede ser modificado al reaccionar con estas EROs. Así, la oxihemoglobina se convierte en metahemoglobina cuando reacciona con el O_2^* - o el peróxido de hidrógeno. Otra hemoproteína citoplasmática, la catalasa, también es inhibida por los radicales superóxido, que la convierten en sus formas inactivas ferroxi y ferrilo.

Los radicales libres pueden reaccionar con aminoácidos que contengan grupos insaturados o azufre. De esta manera, las proteínas con elevada proporción de fenilalanina, histidina, tirosina, triptófano, cisteína o metionina son más susceptibles al ataque de la EROs. En este sentido, se ha comprobado que enzimas tales como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la papaína o la superóxido dismutasa (SOD), cuya actividad depende de estos aminoácidos, se inhiben en presencia de ciertos radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con todos estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares.

Los enlaces peptídico pueden ser dañados por las EROs. Estos enlaces se rompen después de la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido.

Por último, la reacción de las EROs con las proteínas también puede generar subproductos que amplifiquen el daño inicial, como cuando el triptófano se oxida hasta H_2O_2 y N-formilquinurena, este compuesto reacciona con algunos grupos amino y provoca entrecruzamiento entre proteínas, lípidos o ambos.

Lípidos

Un claro ejemplo de este hecho lo constituye la peroxidación lipídica que consiste en una reacción en cadena, la cual proporciona un suministro continuo de radicales libres los que inician la peroxidación subsecuente.

Los radicales libres hidroxilo y perhidroxilo y el oxígeno singlete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metílenos de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico (L^{\bullet}). Los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C-H, el radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular que produce un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peroxilo que puede dar lugar a endoperóxidos, o bien tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido.

Los hidroperóxidos lipídicos son compuestos estables, pero si entran en contacto con iones metálicos de transición, producen más radicales libres que pueden iniciar y propagar otras reacciones en cadena. De esta manera, se altera la estructura de las membranas y, por tanto, su función. Los productos finales de la peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis.

El malondialdehído, otro producto final de la peroxidación de los ácidos grasos, puede causar entrecruzamientos y polimerización entre los distintos componentes de las membranas, así como reaccionar con las bases nitrogenadas del DNA.

Ácidos nucleicos.

Gran parte de la citotoxicidad de las EROs es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con esas especies. Esas modificaciones químicas provocan reacciones de entrecruzamiento y, en muchos casos, la ruptura de las hebras del DNA. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, entonces se produce una mutación, o muere la célula.

Las EROs que se generan en las mitocondrias atacan las proteínas, los lípidos y el DNA de estos orgánulos. Puesto que el DNA mitocondrial no tiene histonas unidas, es más susceptible al daño oxidativo que el DNA nuclear.

Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son dañados en menor proporción que otras moléculas por las EROs. Monosacáridos tales como la glucosa, el manitol o ciertos azúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de las EROs, en este caso fragmentándose para dar unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) demostraron que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, lo que provoca un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

3.5 DEFENSAS CELULARES FRENTE A LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Los organismos aerobios poseen mecanismos para neutralizar los radicales libres que, en pequeñas cantidades, se están produciendo continuamente en el metabolismo. La citocromo oxidasa del sistema de transporte electrónico mitocondrial actúa como sumidero retirando el oxígeno que, de otra manera, podría ser convertido en radicales libres de oxígeno. Pero las células disponen, además, de complejos sistemas enzimáticos y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo originado por elevadas concentraciones de radicales libres. Los sistemas de defensa antioxidante primarios o preventivos disminuyen la velocidad de inicio de las reacciones de los radicales libres porque hacen decrecer sus concentraciones. Los sistemas de defensa antioxidante secundarios o rompedores de cadena atrapan los radicales propagadores, deteniendo su efecto nocivo en las etapas iniciales.

3.6 SISTEMAS DE DEFENSA PRIMARIOS

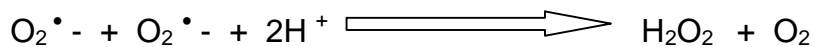
Enzimas

Diversas enzimas proporcionan una función protectora frente a los oxidantes biológicos por disminuir sus concentraciones intracelulares. Entre ellas se encuentran:

- Superóxido dismutasas.
- Catalasa.
- La glutatión reductasa.
- La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- Y otras.

Superóxido dismutasas.

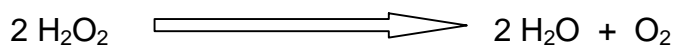
Son las principales enzimas implicadas en la desintoxicación de las EROs. Estas proteínas secuestran $O_2^{\bullet -}$ y catalizan la reacción de dismutación de este radical libre para producir H_2O_2 y O_2 .



Una actividad excesiva SOD Ha de ir acompañada de actividad catalasa o glutatión peroxidasa, ya que, si no es así, se acumula H_2O_2 y, por tanto, es posible la formación de OH^{\bullet} .

Catalasa

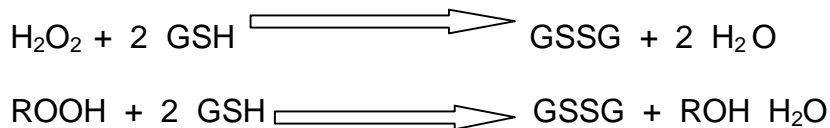
Es una hemoproteína que cataliza la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 .



Esta enzima tiene constantes de velocidad relativamente elevadas, pero presenta una baja afinidad por el sustrato, por lo que resulta fundamental cuando el peróxido de hidrógeno se encuentra en altas concentraciones. La mayor parte de las células contiene catalasa, y en los eucariotas está localizada principalmente en los peroxisomas^{4,5,6,7}.

Glutación peroxidasa dependiente de selenio.

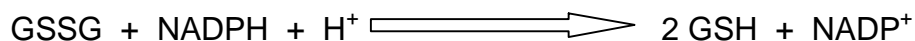
Esta proteína es un miembro de la familia de las peroxidases y cataliza la reducción de H₂O₂ o de peróxidos orgánicos empleando el glutatión reducido como cosustrato.



Tiene cuatro átomos de selenio que le confieren su actividad catalítica. A diferencia de la catalasa, tiene alta afinidad por sus sustratos. Esta enzima está localizada en el citosol de las células eucarióticas, aunque también puede estar en las mitocondrias⁵.

Glutación reductasa.

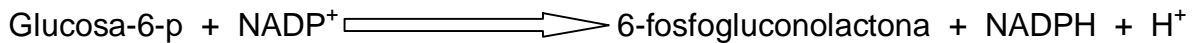
Cataliza la reducción del glutatión oxidado utilizando equivalentes redox en forma de NADPH.



Esta proteína tiene una distribución similar a la de la glutación peroxidasa. Su localización subcelular es, asimismo, citosólica y mitocondrial^{4,5,7}.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La reacción de esta enzima permite la regeneración del NADPH utilizado por la acción de la glutatión reductasa⁵.



Otras enzimas.

Las enzimas que previenen la formación o el metabolismo de especies prooxidantes pueden desempeñar un papel fundamental en la defensa de los sistemas biológicos frente a las EROs. La NADPH: quinona oxidoreductasa (DT-diaforasa) y la epóxido hidrolasa son buenos ejemplos. La primera reduce mediante dos electrones muchas quinonas y la segunda reacciona con diferentes especies epóxido disminuyendo su concentración^{1,5}.

Secuestradores no enzimáticos

- Glutatión.
- Vitamina C.
- Ácido úrico.
- Taurina.
- Proteínas.

Las enzimas descritas constituyen la primera línea de defensa celular frente a los daños oxidativos. En general, funcionan eliminando $\text{O}_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 antes de que interactúen para formar el radical OH^{\bullet} . Pero existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos. Estas moléculas secuestran sin intervención enzimática los radicales libres residuales que escapan de las enzimas antioxidantes.

Glutación.

El glutación (GSH) está presente en altas concentraciones en la mayoría de las células procariontas y eucarióticas. Esta molécula puede reaccionar con las ROS de distintas maneras:

- 1) Puede oxidarse reduciendo H_2O_2 u otros peróxidos en la reacción catalizada por la glutación peroxidasa dependiente de selenio;
- 2) Puede reaccionar directamente con radicales libres tales como O_2^\bullet , OH^\bullet o RO^\bullet para obtener el radical tilo (GS^\bullet) y, posteriormente, el glutación oxidado (GSSG);
- 3) Puede reaccionar con ciertos compuestos electrófilos para formar aductos covalentes.

En estas últimas reacciones intervienen las glutación-S-transferasas^{5,6,7}.

Vitamina C.

La vitamina C (ácido ascórbico) es una molécula hidrosoluble que se encuentra intra y extracelularmente en la mayor parte de los sistemas biológicos. Reacciona directamente con los radicales libres y se convierte en ácido dehidroascórbico. El ácido dehidroascórbico se regenera por la dehidroascorbato reductasa, que utiliza glutación reducido, y lo oxida a GSSG. Otra función importante del ácido ascórbico es restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E^{5,6}.

Ácido úrico.

El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas en la mayoría de las células animales. Este compuesto es un antioxidante importante, capaz de atrapar diversos tipos de radicales libres cuando están en un medio acuoso. Además, se ha comprobado que protege de la oxidación al ácido ascórbico del plasma sanguíneo⁵.

Taurina.

Este β -aminoácido se ha encontrado en la mayoría de las células eucarióticas y también en una gran variedad de fluidos extracelulares. La taurina reacciona directamente con ciertos oxidantes, como el ácido hipocloroso, para formar especies menos reactivas⁵.

Proteínas

Como hemos descrito anteriormente, las reacciones tipo Fenton, en las que se generan radicales libres extremadamente nocivos, están catalizadas por metales de transición. Por tanto, todas las proteínas que disminuyen los niveles de iones metálicos libres, como Fe^+ y Cu^+ , pueden ser incluidas dentro de los sistemas de defensa antioxidante.

La transferrina y la lactoferrina son glucoproteínas que ligan el hierro y lo transportan en la circulación sanguínea. La ferritina almacena este metal intracelularmente⁵.

La ceruloplasmina secuestra iones de cobre para impedir la formación de radicales libres a partir de peróxidos y, además, es capaz de oxidar el ion Fe^+ a Fe^{3+} . El cobre no unido a la ceruloplasmina en el plasma está unido principalmente a la albúmina, pero parece ser que esta no previene su interacción con H_2O_2 para formar el radical hidroxilo^{1,2,5}.

3.7 SISTEMAS DE DEFENSA SECUNDARIOS

Enzimas

- Glutación peroxidasas no dependientes de selenio.
- Oxidorreductasas.
- Proteasas.
- Sistemas enzimáticos de reparación del DNA.

Glutación peroxidasas no dependientes de selenio.

Además de las glutación peroxidasas dependientes de selenio, ya descritas, la mayoría de las células tiene una actividad glutación peroxidasa no dependiente de selenio, a cargo de otras enzimas cuya actividad principal parece estar relacionada con la desintoxicación de xenobióticos y que se conocen con el nombre de glutación transferasas. Estas enzimas también son capaces de metabolizar hidroperóxidos lipídicos de bajo peso molecular. Para actuar sobre los hidroperóxidos, éstos han de ser liberados previamente de los fosfolípidos de membrana^{5,6,7,8}.

Oxidorreductasas.

Todas las oxidorreductasas que participan en la reducción de grupos protéicos oxidados por los radicales libres de oxígeno se consideran sistemas de defensa antioxidante⁵.

Proteasas

Cuando las proteínas son irreversiblemente dañadas, pueden darse reacciones perjudiciales para las células. En este sentido, la degradación de esas proteínas tiene un efecto protector frente a los daños por estrés oxidativo. La macroproteínasa y diversos tipos de enzimas proteolíticas se incluyen en este grupo⁵.

Sistemas enzimáticos de reparación del DNA.

Las enzimas implicadas en los procesos de reparación del DNA se consideran sistemas de defensa antioxidante. La DNA polimerasa I, la DNA ligasa, las endonucleasas o las glucosilasas, encontradas en distintos tipos de eucariotas, son algunos de ellos, cuando el daño al DNA es irreparable, actúa otra enzima diferente, se trata de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa. Esta enzima, que se activa por la ruptura de las hebras del DNA, comienza a añadir grupos de ADP-ribosa a aminoácidos u otros grupos de ADP ribosa previamente unida a las proteínas ligadas al DNA e impide que el DNA se empaquete correctamente. Una activación excesiva de la poli-(ADP-ribosa) sintetasa puede provocar el agotamiento de las reservas de NAD, sustrato de esta enzima, que conduce a un descenso de los niveles de ATP y a la muerte celular^{1,5,6}.

Secuestradores no enzimáticos

- Vitamina E.
- Carotenoides.
- Ubiquinol.
- Bilirrubina.

Vitamina E.

Es la vitamina antioxidante liposoluble distribuida más ampliamente en la naturaleza. En realidad se trata de un conjunto de compuestos estrechamente relacionados denominados tocoferoles, de los cuales el más abundante es el α -tocoferol. Los tocoferoles se encuentran principalmente en las membranas de la mayoría de las células, protegiéndolas de la lipoperoxidación. Normalmente funcionan reaccionando con radicales libres peroxilo (ROO^*), donándoles un hidrógeno y transformándolos en hidroperóxidos lipídicos que luego pueden ser retirados por las glutatión peroxidasas antes citadas. De esta manera se interrumpe la reacción de propagación en cadena de la peroxidación lipídica. El radical α -tocoferoxilo que se origina se reduce por la pareja redox ascorbato- GSH, o bien reacciona con otro radical peroxilo para formar un aducto estable^{5,6}.

Carotenoides

Casi todos los componentes de esta familia de polienos poseen actividad antioxidante. El β -caroteno se acumula en altas concentraciones en las membranas de distintos tejidos. Es capaz de reaccionar con el radical peroxilo para formar otro radical de resonancia estable, que a su vez puede reaccionar con otro radical peroxilo y dar un compuesto no radical libre. Esta reacción se da más fácilmente con concentraciones de oxígeno bajas y complementa la acción de la vitamina E, que funciona más eficazmente con concentraciones de oxígeno altas. Además de los radicales peroxilo, los carotenoides pueden atrapar también otros tipos de radicales libres y, especialmente, el oxígeno singlete⁵.

Ubiquinol.

El ubiquinol o coenzima Q reducida (QH_2) es un antioxidante natural que interviene en la regeneración de la vitamina E y en la eliminación de radicales peroxilo y alcóxilo.

Bilirrubina.

Este producto del catabolismo de las hemoproteínas se ha propuesto recientemente como un antioxidante de gran importancia fisiológica. Posiblemente funciona reaccionando con los radicales peroxilo que se originan durante la lipoperoxidación⁵.

3.8 UTILIDAD DE LOS ANTIOXIDANTES EN LA PREVENCIÓN DE LOS PROCESOS PATOLÓGICOS MEDIADOS POR LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Se han realizado numerosos trabajos de epidemiología humana y de experimentación animal para confirmar el papel preventivo de ciertos nutrientes, principalmente las vitaminas C y E, el β -caroteno, el cinc y el selenio, en las enfermedades en las que están implicadas las EROs⁵. Como acabamos de describir, las vitaminas C y E, así como el β -caroteno, pueden neutralizar directamente la acción de las EROs. El cinc y el selenio forman parte de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.

Existen estudios que demuestran un papel protector del ácido ascórbico en los procesos de oxidación de las LDL^{5,6,7}. Además, el ácido ascórbico previene la disfunción endotelial en humanos, probablemente porque refuerza la formación o la acción del óxido nítrico^{5,6,7}. Por lo que se refiere al cáncer, adicionalmente a su carácter antioxidante general, el papel protector del ácido ascórbico estaría ligado más específicamente a su capacidad de bloquear la formación de nitrosaminas y de mutágenos fetales⁵.

El problema del ácido ascórbico es que puede tener carácter prooxidante en determinadas circunstancias, especialmente cuando se utilizan dosis elevadas. En estas condiciones, la formación de Fe (II) está muy favorecida, superándose la capacidad de su captura por proteínas no enzimáticas y estimulándose, por tanto, la formación de radical libre hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno. De hecho las dosis diarias de 500 mg se han relacionado con la formación de bases oxidadas en el DNA de leucocitos. De todas formas, se necesitan más estudios que confirmen estos resultados y que establezcan el potencial mutágeno y carcinógeno de estas bases oxidadas⁵.

Los efectos antioxidantes de la vitamina E son también muy amplios. Se han realizado muchos estudios que demuestran su papel protector en la oxidación de las LDL y que han sido revisados muy recientemente. Además la vitamina E inhibe la agregación plaquetaria⁵. Se ha observado, sin embargo, que la vitamina E también exhibe carácter prooxidante, ligado al radical α -tocoferoxilo, cuando se utiliza como único agente para la prevención de la oxidación de las LDL. De hecho, estas partículas contienen de forma natural varias moléculas de α -tocoferol, lo que no impide su oxidación. En cambio, la adición de otros antioxidantes (ácido ascórbico, por ejemplo) permite la regeneración del α -tocoferol a partir del radical α -tocoferoxilo, neutralizando su efecto oxidante⁵.

El papel protector del β -caroteno está relacionado fundamentalmente con su capacidad para inhibir la proliferación celular, y existen diversos estudios epidemiológicos que confirman la relación entre la ingestión de este nutriente con una baja incidencia de cáncer⁵.

Aunque la utilización preventiva de antioxidantes se ha realizado sobre todo en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, también hay estudios relevantes sobre otras enfermedades. A título de ejemplo, señalemos que se ha relacionado la incidencia del asma con la falta de selenio (cofactor de la glutatión peroxidasa) y con la ingestión dietética baja de vitamina C y E. Esta relación podría explicarse, como ya hemos descrito, por la activación oxidativa del NF- κ B, factor que desempeña un papel importante en la inflamación asmática. Otros estudios también relacionan los daños neurológicos derivados de la isquemia cerebral con la activación del NF- κ B, proporcionando así una explicación para el papel neuroprotector de una serie de compuestos no naturales de carácter antioxidante⁵.

En resumen, los estudios epidemiológicos indican claramente la bondad y seguridad de las dosis nutricionales de los antioxidantes, pero plantean dudas sobre la eficacia y la seguridad de las dosis elevadas, especialmente para la vitamina C y el β -caroteno. Parece razonable, por tanto, recomendar la utilización equilibrada de antioxidantes, no sólo de los citados, sino de los otros antioxidantes naturales presentes en los alimentos^{5,6,7}.

3.9 MODELO ANIMAL.

A pesar de la disponibilidad de varios modelos de ratón existentes para el estudio de auto inmunidad, el modelo animal que en este estudio se emplea, es el ratón desnudo et / et que fue observado en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones albinos de la cepa CD1 en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores (FES) de la Universidad Nacional Autónoma de México, es un ratón hipotímico alopécico derivado por una mutación espontánea de la cepa albina CD1, como un resultado de un gen recesivo autosómico simple, los animales son obtenidos al aparear machos y hembras $et/+$, o bien machos y hembras et / et . A este ratón se le llamo CD1 et / et , el símbolo “ et ” se ha adoptado para referir a la forma mutante, estos ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales de bioterio, con libre acceso al alimento y agua. Este ratón mutante tiene las siguientes características: desnudo, fertilidad baja, mortalidad alta, vida corta, hipotímico y su promedio de vida son de 2 años y es común que los animales desarrollan espontáneamente todo el cuadro clínico de una *uveorretinitis espontánea crónica* a anticuerpos contra antígeno S de retina, tiene un número mayor de CD3 con relación al ratón eutímico (CD1).

4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es posible conocer el nivel de la actividad de los sistemas prooxidante / antioxidantes, determinando la concentración de alguno de los radicales libres en plasma, así como algunos de los antioxidantes intactos que de manera continúa generan y detoxifican oxidantes, como lo son las enzimas, superóxido dismutasa, peroxidación lipídica y la proteína ceruloplasmina que pueden secuestrar iones de hierro y cobre en formas que evitan su participación en reacciones que generan el agresivo radical hidroxilo.

Además para poder conocer si hay mayor actividad de estrés oxidativo en los ratones con exocrinopatía espontánea, comparando con ratones que no presentan la exocrinopatía espontánea como lo son los ratones con pelo (+ / +), así se cree, se puede establecer si en verdad el estrés oxidativo es un factor importante en la exocrinopatía espontánea, también se medirá el nivel del estrés oxidativo en ratones heterocigotos et / +, esto como un intermedio entre las dos cepas para ver si en verdad el comportamiento del estrés oxidativo va en aumento a mayor exocrinopatía espontánea, que se cree que hay más en el ratón et / et, y ver de ese modo si esta participando en la exocrinopatía espontánea.

5.0 HIPÓTESIS

La exocrinopatía espontánea es una enfermedad autoinmune que genera moléculas oxidativas que provocan la aparición de estrés oxidativo, de ahí que se espera que este proceso tenga una participación significativa en dicha enfermedad en los ratones *et / et* que la padezcan, en relación a los ratones que no la presentan *et / +* y *+ / +*.

6.0 OBJETIVOS

Objetivos generales.

Evaluar la participación del estrés oxidativo en los ratones et / et que presentan exocrinopatía espontánea, comparados con los ratones portadores $et / +$ y con progenitores homocigóticos $+ / +$. Determinando la presencia de nitritos y enzimas antioxidantes.

Objetivos particulares.

- Observar el grado del daño ocular por observación directa.
- Extraer y pesar las glándulas, lagrimales, submaxilares y bazo.
- Determinar radicales libres de forma indirecta por medio de lipoperoxidación siguiendo el método de Aust, 1994 (ácido tiobarbitúrico).
- Determinar en los eritrocitos de estas cepas la superóxido dismutasa usando un equipo de diagnóstico de RANSDOD (RANDOX) cat SD125.
- Cuantificar nitritos en plasma por medio de espectrofotometría UV/Visible.
- Medir la concentración de Ceruloplasmina por el método de Inmunodifusión radial simple en plasma.
- Y analizar la determinación del NBT por espectrofotometría.

7.0 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Tipo de estudio:

- Observacional.
- Prospectivo.
- Transversal.
- Comparativo.

Población de estudio:

Se incluyen tres cepas de ratones que son:

24 homocigóticos dominantes (+/+).

24 heterocigóticos portadores del gen (et / +).

23 homocigóticos recesivos (et / et). Presentan exocrinopatía espontánea.

El estudio se realizó en ratón CD 1 et / et que presenta exocrinopatía espontánea, caracterizado por ausencia de pelo, baja fertilidad, inmunodeficiencia, tamaño reducido e hipotímico.

Criterios de:

-Inclusión:

Ratones vivos, aparentemente sanos, mantenidos en condiciones de bioterio y sin administración de fármaco alguno, de ambos sexos de 20 semanas de edad.

- Ratones et / et los cuales muestran una gama de lesiones visibles.
- Ratones et / +.
- Ratones + / +.

Todos los grupos tienen 20 semanas de edad (tiempo en que los ratones et / et muestran ya la exocrinopatía).

-Exclusión:

A los ratones que no cumplan con 20 semanas de edad, que se encuentren enfermos o con previa administración de algún fármaco.

-Eliminación:

A aquellos ratones que durante el estudio enfermaron o murieron.

Variables:

Cuantitativa continua: Cuantificación indirecta de radicales libres y enzimas que intervienen en el estrés oxidativo.

Cualitativa nominal: A los ratones se les asigna un número relacionándolos a la presencia de lesiones observadas con el siguiente rango: 0= ojos sanos, 1= ojos inflamados, 2= ojos con cataratas, 3= ojos perdidos.

Cualitativa nominal: Ratones con presencia o no de exocrinopatía, ratones con pelo o desnudos.

8.0 MATERIAL

8.1 MATERIAL Y EQUIPO

Material

1. Agitador de vidrio.
 2. Equipo de microdisseccion.
 3. Gradilla de metal para tubos de ensayo.
 4. Matraz Kitazato. 1000 mL, 500 mL
 5. Matraz volumétrico 1000 mL, 500 mL, 100mL, 50 mL.
 6. Mechero Bunchner
 7. Micro pipetas 10-50 μ L, 200 μ L, 100 μ L.
 8. Papel parafilm Laboratory FILM
 9. Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL.
 10. Placas 35 * 14 mm Falcon 3046 BECTON DICKSON
 11. Probeta graduada de 100 mL
 12. Puntas para pipetas.
 13. Tela de alambre con asbesto
 14. Tripie metálico para mechero.
 15. Tubos de ensayo.
 16. Tubos eppendorf.
 17. Vasos de precipitados de 100mL, 250 mL, 500 mL.
 18. Vidrio de reloj.
-

Equipo

| NOMBRE | MARCA |
|--------------------------|-----------------------------------|
| 1. Agitador vórtex-genie | Scientific industries NC |
| 2. Balanza analítica | Mettler H 80 |
| 3. Balanza granataria | Ohaus |
| 4. Baño Maria | Lab-line |
| 5. Bomba de vacío | Feli-Welch |
| 6. Centrifuga | Hamilton Bell Mod. VanGuard V6500 |
| 7. Centrifuga | HERMLE Z 233 M - 2 |
| 8. Congelador -20° C | Fisher scientific Isothermp |
| 9. Espectrofotómetro | Bausch & Lomb |
| 10. Refrigerador | Phillips 127 volts-VA |
| 11. Rocker Platform | Bellco Glass, Inc |

Reactivos

| NOMBRE | PROVEEDOR |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1. Agua destilada | THEISSIER |
| 2. Ácida de sodio | Merck – Schuchardt |
| 3. Ácido acético | Productos Químicos Monterrey S. A. |
| 4. Ácido clorhídrico | E. M. Industries Canadá |
| 5. Ácido ortofosforico | |
| 6. Agarosa | Bioxon de México S.A. de C. V. |
| 7. Borato de sodio | J. T. Baker S. A. de C. V. |
| 8. Buffer referencia de fosfatos | Hycel de México S. A. De C. V. |
| 9. Butiril-hidroxitolueno (BHT) | Monterrey S. A. de C. V. |
| 10. Cadmio metálico | Técnica Química S. A. |
| 11. Cianuro de potasio 0.01 M | Preparada |
| 12. Cloruro de amonio | J. T. Baker S. A. de C. V. |
| 13. Cloruro de sodio | J. T. Baker S. A. de C. V. |

| | |
|--|--------------------------------|
| 14. Éter | J. T. Baker S. A. de C. V. |
| 15. Heparina | Abbot |
| 16. Hidróxido de sodio | Merck-México, S. A. |
| 17. n-Butanol | J. T. BAKER S. A. de C. V. |
| 18. Nitrito de sodio | J. T. Baker S. A. de C. V. |
| 19. N-(1-naftil)etilendiaminodiclorhidrato | Merck |
| 20. Nitro blue tetrazolium | SIGMA |
| 21. PBS | BECKMAN COULTER |
| 22. Piridina | BAKER ANALYZED |
| 23. Polymorphprep TM | AXIS - SHIELD |
| 24. Silicon | Sigmacote |
| 25. Solución Drabkin | Preparada |
| 26. Solución Krebs-H | Wiener lab. |
| 27. Solución salina 0.8 % | Baxter |
| 28. Sulfato de cobre | Tec. Clínica |
| 29. Sulfato de cinc | Hycel de México S. A. De C. V. |
| 30. TBA | |
| 31. Tetrametoxipropano | ALDRICH |
| 32. Vial para peroxidación lipídica | |
| 33. Vial para superóxido dismutasa | |
| 34. Xantin oxidasa | |
| 35. Zimosan A | SIGMA |

8.2 Material biológico

En este estudio se emplearon 71 ratones machos y hembras mantenidos bajo las condiciones de bioterio, con control de ciclo de luz-oscuridad, cambio de cama de viruta de madera cuatro veces por semana y con libre acceso al agua y alimento.

| CEPA | RATONES | NUMERO DE RATONES |
|------|-----------|-------------------|
| 1 | CD1 +/+ | 24 |
| 2 | CD1 et/+ | 24 |
| 3 | CD1 et/et | 23 |

- Suero de conejo anticerculoplasmina de ratón.

9.0 MÉTODO

9.1 OBTENCIÓN DE SANGRE, INSPECCION DE OJOS, EXTRACCIÓN Y PESO DE GLANDULAS

- A cada uno de los ratones se les realizó una inspección para localizar lesiones en ojos y se pesaron en una balanza granataria.
- Se anestesió en cámara de éter por separado a cada ratón, para tener tiempo de la incisión.
- Se sangró por incisión axilar a blanco, colectando la sangre en tubo de 12 * 75 heparinizada y homogenizando.
 - I. Se tomaron 20 μ L en 5 mL de solución de Drabkin mezclar bien, dejar reposar 10 min. y leer a 550 nm para determinar Hb.
 - II. Se tomo 1 mL para la técnica de NBT.
 - III. Tomar 50 μ L para realizar la técnica de SOD inmediatamente.
 - IV. Se centrifugaron los tubos y se tomaron del plasma.
- 100 μ L para determinar nitritos.
- 100 μ L + 10 μ L de BHT 2 mM para peroxidación lipídica.
- El resto del plasma se colocó en un tubo Eppendorf para determinar ceruloplasmina y como reserva.

Estas muestras de plasma se congelaron a -20° C hasta su uso.

A los cadáveres se les extrajo con equipo de disección las glándulas submaxilares, lagrimales izquierda y derecha, también el bazo, que inmediatamente se pesaron en la balanza analítica.

9.2 DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Método de TBA.

I.

- Se colocó cada una de las muestras en un tubo heparinizado.
- Se centrifugó a 3000 rpm / 5 minutos.
- Se separó el plasma y se agregaron 10 μ L de BHT 2 mM.
- Se colocaron 400 μ L de plasma con 50 μ L de BHT 12.6 mM y 400 μ L de ácido ortofosfórico 0.2 M.
- Se mezcló en vortex por unos 10 segundos.
- Se adicionó 50 μ L de TBA 0.11 M / L y se mezcló con vortex nuevamente.

II.

- Los tubos con la mezcla de reactivos se les tapo con papel aluminio y se colocaron en un baño de agua a 90 °C / 45 minutos.
- Pasado el tiempo a los tubos se les colocó en hielo y se les agregó 1000 μ L de n-butanol y 100 μ L de NaCl solución saturada. Agitar vigorosamente / 30 segundos.
- Se centrifugó a 5000 rpm / 1 minuto.
- Se transfirió 500 μ L de la fase de butanol a una celda.
- Finalmente se midió la absorbancia a 535 nm.

REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPIÍDICA

Estándar: Tetrametoxipropano (TMP).

- Ácido ortofosfórico 0.2 M.
- TBA .11 M / L: 800 mg de TBA disueltos en 50 mL de NaOH 0.1 M.
- n-butanol.
- Butiril-hidroxitolueno (BHT) 12.6mM.
- NaCl solución saturada.

Curva de calibración:

- Solución madre: 1m M / L de TMP (tetrametoxipropano) 17 μ L de TMP en 100 mL de agua bidestilada.
- Solución de trabajo: 0.2 mM / L (1 mL de TMP 1 mM / L y añadir 4 mL agua bidestilada) Nota. Preparar en cada uso.
- Realizar 7 diluciones.

| tubo | TMP | agua | TBA 1 % |
|------|-----|------|---------|
| 1 | 0 | 600 | 150 |
| 2 | 20 | 580 | 150 |
| 3 | 50 | 550 | 150 |
| 4 | 100 | 500 | 150 |
| 5 | 200 | 400 | 150 |
| 6 | 400 | 200 | 150 |
| 7 | 500 | 100 | 150 |
| 8 | 600 | 0 | 150 |

Se incubaron durante 15 minutos en un baño de agua hirviendo, se le adicionó 4 mililitros de n-butanol, la solución se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se leyó a 532 nm.

9.3 DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA

*Determinar hemoglobina en la muestra de sangre, por la técnica de cianometahemoglobina Drabkin¹⁵ (ver anexo 1).

I. Procesamiento de la muestra.

- Se tomó 50 μ L de sangre heparinizada y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Se aspiró el plasma, y a los eritrocitos se les lavó 4 veces con 1mL de NaCl al 0.9 %, en cada uno de los lavados se centrifugó a 3000 rpm / 10 minutos.
- En el último lavado el botón se resuspendió en 200 μ L de agua bidestilada fría, se mezcló y se dejó reposar en baño de hielo a 4 °C durante 15 minutos.
- El lisado se diluyó 1:25 con el buffer de fosfatos 0.01 mol /L pH 7 (20 μ L del lisado + 480 μ L de buffer fosfatos 0.01 M pH 7).

II. Preparación de reactivos.

- a) Sustrato. (Un vial del sustrato con 20 mL de buffer).
- b) Xantin oxidasa (un vial con 10 mL de agua bidestilada).
- c) Estándar (un vial del estándar con 10 mL de agua bidestilada).

III. Desarrollo de la técnica.

- En todos estos puntos siguientes se trabajó en baño María, a 37 °C y las muestras se trabajaron una por una.

| | BLANCO | ESTANDAR | MUESTRA |
|--------------------|---------------|----------|---------|
| 1. Muestra. | - | - | 12.5 µL |
| 2. Estándar. | - | 12.5 µL | - |
| 3. Diluyente. | 12.5 µL | - | - |
| 4. Sustrato. | 425 µL | 425 µL | 425 µL |
| | M E Z C L A R | B I E N | |
| 5. Xantin oxidasa. | 62.5 µL | 62.5 µL | 62.5 µL |

9.4 DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN PLASMA DE RATON

- Activación del cadmio (ver anexo 2).
- A 100 μL de plasma se le adicionó 300 μL de agua bidestilada (la dilución es 1:4) y se le adiciono 20 μL de la solución de Zn SO_4 , se mezclo bien y el precipitado se separó por centrifugación a 10,000 g por 5 minutos.
- A el tubo con el cadmio activado se le tira el $\text{NH}_4 \text{Cl}$ escurriendo bien, se adicionó al tubo todo el sobrenadante de la muestra y se deja en agitación, tapados con parafilm en un rocker durante 15 minutos.
- Se centrifugarón los tubos a 3500 g durante 5 minutos y se tomaron 200 μL del sobrenadante para el ensayo.
- La concentración para el estándar se preparó al momento con una concentración de 2 μL del sobrenadante para el ensayo.

CURVA DE CALIBRACIÓN

| Tubo | Estándar (μL) | Agua destilada (μL) |
|---------|---|-------------------------------------|
| 1 | 0 | 900 |
| 2 | 100 | 800 |
| 3 | 200 | 700 |
| 4 | 300 | 600 |
| 5 | 400 | 500 |
| 6 | 500 | 400 |
| Muestra | Se trabajo con 200 μL del sobrenadante. | 700 |

Se adicionó 50 μL de sulfanilamida. Y se incubo 10 minutos (temperatura ambiente).

Se adicionó 50 μL del reactivo de NED, se mezcló e incubar 30 minutos (temperatura ambiente).

Se hicieron las lecturas a 540 nm.

Preparación de reactivos.

- Solución acuosa de ácido acético al 15 % (V / V).
- Reactivo de sulfanilamida. Se disolvió 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15 %. Se etiqueto y guardo en un frasco de vidrio color ámbar con tapa de plástico, protegido de la luz y en un lugar fresco.
- Reactivo de NED. Se disolvió 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato en 150 mL de ácido acético al 15 %. Se etiqueto y guardo en un frasco de vidrio color ámbar con tapa de plástico, protegido de la luz y en un lugar fresco.
- Sulfato de cinc para desproteinizar. Se preparo una solución de Zn SO_4 , pesando 300 g de $\text{Zn SO}_4 / \text{L}$ o 30 g / dL.

9.5 DETERMINACIÓN DE CERULOPLASMINA POR EL MÉTODO DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL¹⁶

- Se preparó la agarosa al 1 % (1 g de agarosa en 100 mL de PBS agregando aproximadamente 0.5 g de ácido de sodio).
- Se preparó la serie de tubos a los cuales se les agregaron 2 mL de agarosa al 1 % Todos los tubos colocados en baño María a 37° C.
- Se preparó placas 35 x 14 mm, Falcón 3046 BECTON DICKSON. Bien limpias y secas.
- A los tubos que contienen 2 mL de PBS por separado y de uno en uno se les agregó 150 µL de suero anticeruloplasmina, se mezcló bien en vortex y se colocó en las placas, tubo por pozo.
- Ya colocada la mezcla de agarosa con suero en los pozos se dejó que solidificara la mezcla.
- Al solidificar la mezcla se realizaron orificios en la agarosa solidificada sin romper y en las posiciones de las horas del reloj (3, 6, 9 y 12 y uno en el centro).
- Ya hechos los orificios se le colocó a cada uno 5 µL de plasma de ratón.
- Las lecturas se realizaron a 48 horas (fig. 5 y 6). Sabiendo que el estándar tiene de lectura de diámetro de 0.4 cm. Y de este dato se logró obtener las concentraciones de los demás sueros al conocer sus diámetros.

9.6 REDUCCIÓN DE NITRO AZUL DE TETRAZOLIUM (NBT)

Preparación de la suspensión celular.

- Se tomó 1 mL de sangre total con EDTA.
- Se estratificó la sangre sobre 0.8 mL de polymorphoprep en un tubo de 13 x 100 mm y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos.
- Con una pipeta Pasteur se obtuvo el anillo de polimorfonucleares y se colocó en un tubo previamente siliconizado y seco.
- Se adicionó solución de Krebs-Henseleit ((K-H) aproximadamente 0.5 a 1.0 mL como un primer lavado.
- Centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
- Se tiró el sobrenadante.
- Se resuspendió el botón y agregue más solución de K-H para un segundo lavado.
- Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
- Se tiró el sobrenadante, resuspendí el botón y agregue 170 µl de K-H.
- Esto se etiquetó como suspensión celular.

Opsonización del zymosan.

- Se pesaron 10 mg de zymosan A y lo resuspendí en 5 mL de agua destilada.
- Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos (1-2 lavados). Luego de tirar el sobrenadante resuspende el botón.
- Se adicionó 1 mL de suero fresco.
- Se incubó a 37° C en baño de agua por 20 minutos.
- Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón.
- El sedimento se resuspendió en 5 mL de sol K-H.
- Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se resuspendió el botón.
- Se adicionó 1 mL de solución K-H.

DESARROLLO DE LA TÉCNICA

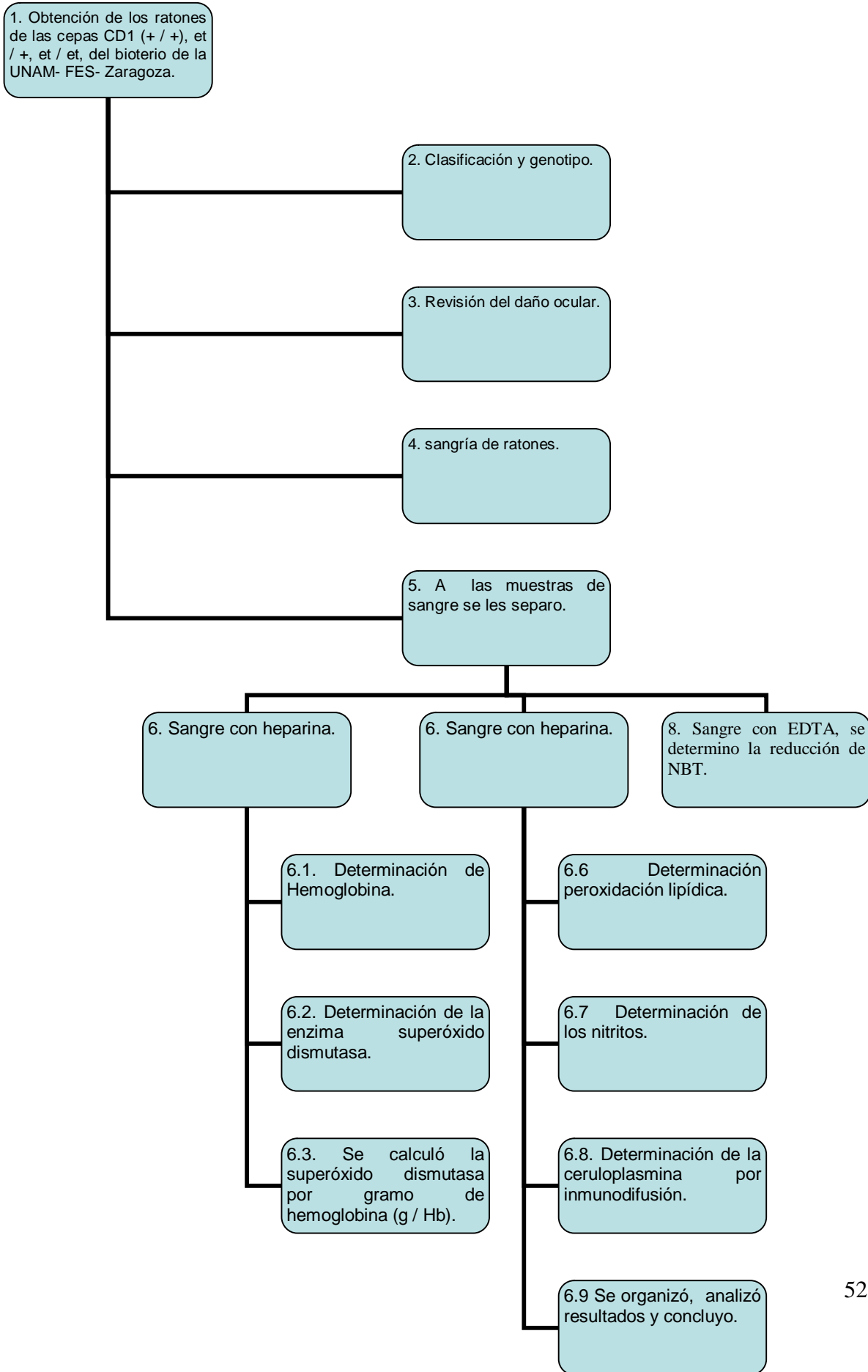
(en tubos siliconizados)

| | Fagocitando | En reposo |
|--|-------------|-----------|
| 1. NBT al 0.1 % en salina (mL) | 0.4 | 0.4 |
| 2. KCN (mL) | 0.1 | 0.1 |
| 3. Solución K-H (mL) | 0.35 | 0.4 |
| 4. Zymosan (μ L) | 50 | - |
| 5. Suspensión celular (mL) | 0.1 | 0.1 |
| 6. A baño María 37° C por 20 minutos. | | |
| 7. Detener la reacción con HCl 2.5 N. (mL) | 2.0 | 2.0 |
| 8. Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos, tirando el sobrenadante y resuspender. | | |
| 9. Piridina (mL) | 4.0 | 4.0 |
| 10. Baño María, 37 °C por 20 minutos. | | |
| 11. Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos. | | |
| 12. Leer en espectrofotómetro a 515 nm. | | |
| 13. Calibrar el espectrofotómetro con piridina como blanco. | | |

Diseño estadístico

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con un α de 0.05, como prueba Post Hoc se uso la prueba de Tukey HSD.

10. DIAGRAMA DE FLUJO



11. RESULTADOS

Los ratones fueron identificados según su genotipo, en animales normales + / + (1), ratones desnudos hipotímicos et / et (2) y los heterocigóticos o portadores et / + (3). Y de cada ratón se registro su cepa 1, 2 y 3. El sexo; hembra (1) y macho (2), peso corporal, peso relativo de las glándulas; lagrimales, submaxilares y el bazo. También se registraron lesiones visibles en ojos como: inflamación (Figura 2), cataratas (Figura 3) y ojos perdidos (figura 4). Se le asigno un número a cada tipo de lesión de acuerdo con el grado de daño teniendo así; ojos sanos (0), ojos inflamados (1), ojos con cataratas (2) y ojos perdidos (3).



Figura 1. Ratón et / et con el ojo izquierdo sano (0). Se puede apreciar que en el ojo del ratón aun no existen características de daño ocular.



Figura 2. Imagen donde se puede apreciar un ratón et / et con el ojo inflamado (1). Es claro ver la inflamación del ojo en este ratón y es más notorio si comparamos esta imagen con la figura 1.



Figura 3. Ratón en el que se puede observar que el ojo izquierdo tiene cataratas (2) en mínima proporción y el ojo derecho en mayor proporción a punto de perderse (3). Las cataratas se distinguen como una capa de color blanco que en algunas partes se interrumpe como cicatrices dentro del ojo en forma de filamentos.



Figura 4. Imagen en donde se ve claramente que el ojo derecho de este ratón está perdido (3), la pérdida del ojo está descrita por que está reventado en su forma esférica, además de la resequead como consecuencia de la falta de secreción lagrimal, sin signos de vida y mucho menos de visibilidad.

Registro de los diferentes tipos de daño ocular

| Cepa | | et / et | | + / + | | et / + | |
|--------------------------------------|-----------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Sexo | | macho | hembra | macho | hembra | macho | Hembra |
| | | 11 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| <u>Ojos sanos</u> (0) | Derecho | 1 | 5 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| | Izquierdo | 2 | 3 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| <u>Ojos inflamados</u> (1) | Derecho | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Izquierdo | 5 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Ojos con cataratas</u> (2) | Derecho | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Izquierdo | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Ojos perdidos</u> (3) | Derecho | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Izquierdo | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <u>Peso corporal promedio</u> (g) | | 34.81 | 30.91 | 53.83 | 43.66 | 45.5 | 38.00 |

Tabla 1. Daño en ojos y peso corporal promedio para cada cepa de ratones. El peso corporal de los ratones es muy importante, ya que es necesario para obtener el peso relativo de las glándulas de cada uno de los ratones, se obtienen los pesos relativos al dividir el peso de cada glándula entre el peso de cada ratón y como resultado tendremos datos muy pequeños que después se multiplican por 1000 si el número tiene exponente ⁻³, y por 10000 si el dato tiene como exponente ⁻⁴, con esto se evita el manejo de números muy pequeños y además los resultados son relativos unos de otros.

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso de la glándula}}{\text{Peso del ratón}} \text{ por } (1000 \text{ si } ^{-3}) \text{ ó por } (10000 \text{ si } ^{-4}).$$

TABLAS DEL ESTUDIO.

Peso de glándulas submaxilares

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|---------|
| + / + | 2.8438 | 0.30814 |
| et / + | 4.9100 | 0.3853 |
| et / et | 8.2083 | 0.3286 |

Tabla 2. Media y error estándar del peso relativo de las glándulas submaxilares. + / + vs et / + p = 0.001, + / + vs et / et p = 0.001, et / + vs et / et p = 0.001.

Peso del bazo

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|--------|
| + / + | 3.4392 | 0.1854 |
| et / + | 4.1467 | 0.1582 |
| et / et | 4.7157 | 0.2059 |

Tabla 3. Media y error estándar del peso relativo del bazo.+ / + vs et / + p = 0.021, + / + vs et / et p = 0.001, et / + vs et / et p = 0.081.

Glándulas lagrimales

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|--------|
| + / + | 6.6104 | 0.6806 |
| et / + | 6.7480 | 0.5023 |
| et / et | 6.0622 | 0.5087 |

Tabla 4. Media y error estándar del peso relativo de las glándulas lagrimales.+ / + vs et / + p = 0.984, + / + vs et / et p = 0.778, et / + vs et / et p = 0.677.

Enzima superoxido dismutasa por gramo de hemoglobina

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|---------|
| + / + | 1076.5800 | 79.2501 |
| et / + | 1304.6871 | 60.5790 |
| et / et | 1203.3130 | 54.0964 |

Tabla 5. Media y error estándar de la concentración de la enzima súperoxido dismutasa por gramo de hemoglobina. + / + vs et / + $p = 0.042$, + / + vs et / et $p = 0.370$, et / + vs et / et $p = 0.527$.

Nitritos

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|--------|
| + / + | 38.8796 | 3.1598 |
| et / + | 39.6413 | 2.3303 |
| et / et | 85.6074 | 7.5827 |

Tabla 6. Media y error estándar de la concentración de nitritos μMol . + / + vs et / + $p = 0.0818$, + / + vs et / et $p = 0.001$, et / + vs et / et $p = 0.001$.

Ceruloplasmina

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|-------|
| + / + | 294.75 | 8.017 |
| et / + | 353.25 | 12.58 |
| et / et | 327.52 | 8.587 |

Tabla 7. Media y error estándar de la concentración de ceruloplasmina $\mu\text{g/mL}$. + / + vs et / + $p = 0.001$, + / + vs et / et $p = 0.061$, et / + vs et / et $p = 0.173$.



Figura 5. En esta se puede apreciar los halos como resultado de la interacción entre la ceruloplasmina y su anticuerpo específico. También es posible ver la diferencia del tamaño unos de otros, lo que nos muestra la diferencia que existe entre muestra y muestra.

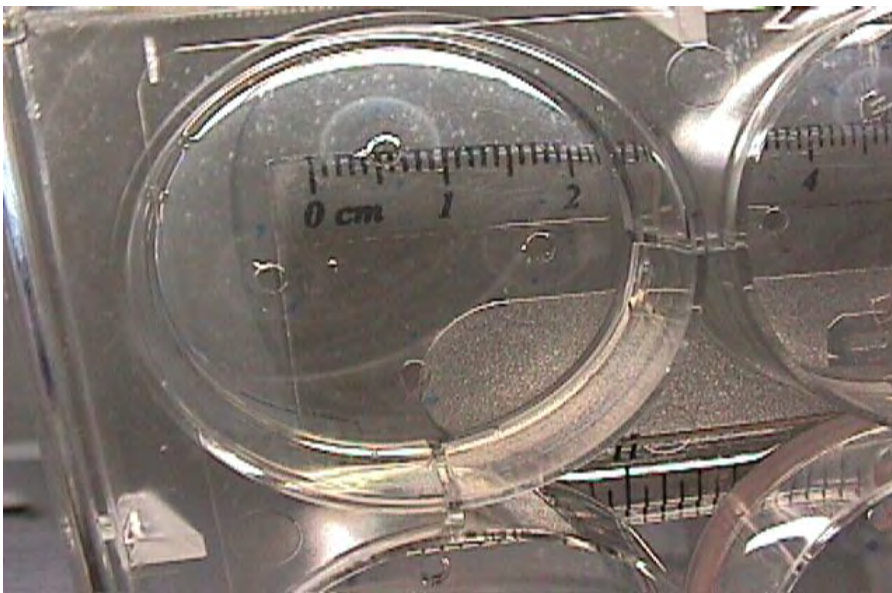


Figura 6. Medición de los halos de la inmunodifusión radial entre la ceruloplasmina y su anticuerpo específico.

Peroxidación lipídica

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|--------|
| + / + | 0.6329 | 0.0499 |
| et / + | 0.5458 | 0.0329 |
| et / et | 0.5990 | 0.0972 |

Tabla 8. Media y error estándar de la concentración de la peroxidación lipídica μ Mol/L.
 + / + vs et / + $p = 0.607$, + / + vs et / et $p = 0.928$, et / + vs et / et $p = 0.833$.

NBT

| Cepa | \bar{X} | EE |
|---------|-----------|-----------|
| + / + | 0.008200 | 0.0027092 |
| et / + | 0.030833 | 0.0080474 |
| et / et | 0.146000 | 0.0111684 |

Tabla 9. Media y error estándar de la reducción del NBT. + / + vs et / + $p = 0.196$, + / + vs et / et $p = 0.001$, et / + vs et / et $p = 0.001$.

12. DISCUSIÓN

La exocrinopatía espontánea es una enfermedad autoinmune que genera moléculas oxidativas que provocan la aparición de estrés oxidativo, desde el punto de vista macroscópico esos factores generan lesiones oculares tales como: características de inflamación Fig. 2, cataratas Fig. 3 y hasta la pérdida del ojo Fig. 4; presentes sólo en los ratones et / et y no fueron visibles en las dos cepas restantes, lo cual nos señala que las lesiones se asocian a la cepa et / et, esto debido a que esta cepa presenta mayor respuesta autoinmune a anfígeno S de retina^{8,13}, factor que hace posible la muy marcada diferencia con respecto a las otras dos cepas.

Otro factor que también influye es que estos ratones presentan un cuadro similar a lo que en el área médica es el Síndrome de Sjögren (SS) el cual presenta en los ojos resequedad debido a la disminución en tamaño y funcionalidad de las glándulas lagrimales¹⁴, además la falta o deficiencia de lubricación también es un factor que participa en la inflamación.

Para dar respuesta al objetivo general de la tesis se utilizó estadística paramétrica mediante el método ANOVA que determina diferencia de medias, en este caso de análisis de nitritos, SOD, peroxidación lipídica, ceruloplasmina, NBT, estudio patológico de bazo, glándulas submaxilares y lagrimales en diferentes cepas de ratones.

Se extrajo glándulas submaxilares y lagrimales para demostrar que en un proceso autoinmune existe destrucción de glándulas, se eligió a estas, por que de acuerdo a la literatura¹, en el SS el daño en éstas es una de las características, una forma de demostrar que la destrucción de glándulas esta ocurriendo, fue obtener el peso relativo y con ello determinar en cual cepa el peso de estas glándulas es menor, aun cuando el pesos de las glándulas lagrimales hay diferencia de pesos esta no es significativamente diferente, en lo que se refiere a

las glándulas submaxilares de las cepas que es; $+ / + = 2.84$, $et / + = 4.91$, $et / et = 8.20$, con $+ / +$ vs $et / +$ $p = 0.001$, $+ / +$ vs et / et $p = 0.001$, $et / +$ vs et / et $p = 0.001$, se puede observar que los resultados no son los esperados, ya que el ratón $+ / +$ es el que tiene el menor peso de estas glándulas y et / et es el que tiene el mayor peso, ya que de acuerdo a la bibliografía^{1,8} en el SS existe la destrucción de glándulas, la razón no es posible saberla, pero se cree que esto puede ser debido a las edades de los ratones y que a mayor edad de estos ratones mayor probabilidad de destrucción.

En relación al peso relativo del bazo, los resultados mostraron una diferencia de peso relativo con una media de 4.7157 en el ratón et / et y una media de 3.4392 en el ratón $+ / +$, $+ / +$ vs et / et $p = 0.001$ esta diferencia es debida a que el ratón et / et esta pasando por un proceso autoinmune y como consecuencia tiene un infiltrado mayor de células autorreactivas (Células T, células plasmáticas produciendo anticuerpos etc.) que al pasar por este órgano se depositan y lo dañan causando inflamación.

La enzima SOD es una de las principales enzimas implicadas en la detoxificación de los EROs producto de la inflamación y destrucción de células^{1,4,5}, se esperaba que esta enzima estuviera en mayor concentración en los ratones et / et , pero en los resultados se puede ver que, la concentración (U de SOD/g de Hb) de esta enzima en los ratones; $+ / + = 1076.58$, $et / + = 1304.68$, $et / et = 1203.31$, $+ / +$ vs $et / +$ $p = 0.042$, $+ / +$ vs et / et $p = 0.370$, $et / +$ vs et / et $p = 0.527$, aun cuando es mayor en et / et que $+ / +$ esta diferencia no es estadísticamente significativa, en donde si hay una diferencia significativa es en $+ / +$ vs $et / +$, con este estudio no se puede asegurar el motivo de estos resultados, sin embargo se cree que como el ratón $et / +$ es híbrido algún alelo esta en respuesta al estrés oxidativo con mayor expresión en la producción de esta enzima.

Además de la participación y actividad del sistema antimicrobiano de neutrófilos, en las lecturas de NBT en el ratón *et / et* están muy por encima de la cepa *+ / +*, esto provoca que existan más EROs y como consecuencia hay más producción de esta enzima para contrarrestar al radical que le corresponde ($O_2 \bullet^-$) y convertirlo en O_2 y H_2O_2 que con la colaboración de la catalasa se evita la acumulación de moléculas dañinas para el ser vivo, quedando como producto final agua y oxígeno^{5,6,7}.

Los nitratos que al ser reducidos con Cadmio para formar nitritos y ser analizados por espectrofotometría²², puede verse lo siguiente: las cepas *+ / +* y *et / +* comparadas con la cepa *et / et* son significativamente diferentes ya que *+ / +* vs *et / +* $p = 0.0818$, *+ / +* vs *et / et* $p = 0.001$, *et / +* vs *et / et* $p = 0.001$, en las dos últimas comparaciones existen diferencias significativas, que se relaciona con presencia de inflamación, ya que se encontró en las cepas *et / et* presencia de mayor efecto inflamatorio y por consecuencia destrucción de células, lo que provoca el escape de enzimas y radicales que destruyen a tejido propio.^{2,5}, esto también se relaciona con las lecturas elevadas de NBT en el ratón *et / et* que indica que el sistema antimicrobiano de los neutrófilos tienen mayor actividad en estos ratones.

Con respecto a la proteína ceruloplasmina se puede ver *+ / +* vs *et / +* $p = 0.001$, *+ / +* vs *et / et* $p = 0.061$, *et / +* vs *et / et* $p = 0.173$, donde se puede ver que sólo existe diferencia significativa es en (*+ / +* vs *et / +*), posiblemente al ser *et / +* un híbrido, este ratón quedó con un alelo preparado para la producción en mayor grado de esta proteína, sabemos que esta es un antioxidante¹⁻⁵ que secuestra iones de cobre para impedir la formación de radicales libres a partir de peróxidos, además de oxidar el ion Fe^{2+} a Fe^{3+} , así como, de participar en la fase aguda de la inflamación²⁰.

El resultado de la prueba de reducción del NBT es el siguiente; + / + vs et / + $p = 0.196$, + / + vs et / et $p = 0.001$ y et / + vs et / et $p = 0.001$, se puede ver en las dos últimas comparaciones existen diferencias significativas, lo que nos hace pensar que en el ratón et / et tiene mayor actividad de Neutrófilos que hacen que su sistema antimicrobiano reduzca más NBT, por lo que se presenta un cuadro inflamatorio, causado por algunos de los elementos del sistema antimicrobiano de los neutrofilos¹² (peróxido de hidrogeno, radical superóxido, radical hidroxilo), que provoca un desequilibrio mayor en el estrés oxidativo, por lo tanto un daño cada vez mayor en el ratón, con inflamación en los ojos, existiendo el riesgo de perderlos, como se puede apreciar en las Figuras de la 2 a la 4.

13. CONCLUSIONES

Al comparar y evaluar el estrés oxidativo entre los ratones et / et que presentan exocrinopatía espontánea, y los ratones + / + que no presentan cuadro inflamatorio ni lesiones oculares, se determinó la enzima SOD, antioxidantes (ceruloplasmina) y radicales libres indirectamente (nitritos, peroxidación lipídica y NBT), se pudo observar que en los ratones + / + el estrés oxidativo tiene menores lecturas en antioxidantes, a diferencia de lo que sucede en el ratón et / et en donde se puede ver que las lecturas indirectas de radicales libres y antioxidantes se ven elevadas, los antioxidantes que se elevan como respuesta a los radicales libres y nos hace pensar que el desequilibrio va en aumento inclinándose hacia los radicales libres en la balanza prooxidante / antioxidante, por lo que podemos concluir que el desequilibrio en el estrés oxidativo esta participando en la exocrinopatía espontánea presente en los ratones et / et.

14. PROPUESTAS

Se propone que se continúe estudiando todo lo relacionado a este tema, ya que el análisis del estrés oxidativo se puede expandir a más marcadores. Además de que se podría combinar este estudio con un análisis nutrimental donde se alimente a estos ratones con antioxidantes, para ver si en verdad ayudan a combatir o mejorar el estrés oxidativo y esperando una disminución de la lesión ocular en estos ratones.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Patología estructural y funcional. 7° ed. Madrid: CLSEVIER; 2005: 3-87
2. Cotran R, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcional. 6°ed. U. S. A. McGraw-Hill. Interamericana; 1999: 1-95.
3. Stevens A, Lowz J. Anatomía patológica. 2° ed.. Madrid: Harcourt; 2001: 1-58, 141-148.
4. Fox S. Fisiología Humana. 7° ed. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana; 2003. p.105-117.
5. Gil A, Ruiz Ma D, Sastre A, Schwartz S. Nutrición clínica. Madrid: SEPE; 2001: 83-127.
6. Shuls M, Olson J, Shike M, Ross A. Nutrición en salud y enfermedad. 9° ed. U. S. A.: McGraw-Hill Interamericana; 2001: 863-874.
7. Carula S, Cano A, Cabo R. Longevidad Tratado integral en la salud en la segunda mitad de la vida. Madrid: Medica panamericana; 2004: 74-115, 499-516
8. Marroquín Segura R, Lara Hernández M, Calvillo Esparza R, García Burciaga M, Castro Mussot M, Mora Guevara J, Flores Pimentel M Modelo del síndrome de Sjöngren en el ratón hipotímico CD1 et / et. et al. Vet. Méx. 2002; 34 (2): 129-141.
9. Chihuailaf R, Contreras P, Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo consecuencias y evaluacion1 en salud animal. Vet. Mex. 2002; 33 (3): 265-283.
10. Aydin A, Orhan H, Ahmet S, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. Clinical Biochemistry. 2001; 34 (1): 1-11.
11. Delgado L, Miranda M. Guía practica para el manejo de animales de laboratorio. México: U N A M; 1992; 61-66, 80-90.
12. Suites D, Parslow T, Terr A. Inmunología básica y clínica. 9° ed. Méx. Manual moderno; 1998: 293-316.

13. Marroquín Segura R, Lara Hernández M, Calvillo Esparza R, García Burciaga M, Castro Mussot M, Mora Guevara J, Flores Pimentel M. Autoanticuerpos anti-Ro/ssa, anti-La/ssb y anticuerpos antifosfolípidos, en suero de ratones mutantes et/et que muestran exocrinopatía. Vet. Méx.,38 (3) 2007.
14. Sjögren H. Zur Kenntnis der tranendrusen acta ophthalmol kbbD 1993; 11-1-180.
15. Ríos Olivera G. Manual de prácticas para laboratorio de análisis bioquímico clínico I. Méx. Departamento de impresión de UNAM-FES-Z; 2004; 27-32.
16. Rojas O. Inmunología (de memoria). 2ª ed. D. F. Méx. Editorial Medica panamericana; 2001:24-28,157-162.
17. Stites D. Tristram G. Abba I. Inmunología básica. 9º ed. D. F. Méx. Manual Moderno; 1998; 314-316.
18. NOM-062-ZOO-1999.Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y uso de los animales de laboratorio.
19. NOM-087-ECOL-1995. Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológicos- infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención medica.
20. Henry J. Diagnostico y tratamiento clinico por el laboratorio, 9º ed. Barcelona; Ediciones científicas; 1993: 175-176, 225-234.
21. Marroquín S. Estudios inmunológicos en ratones hipotimicos CD1 et / et que desarrollan oftalmología espontánea. Escuela nacional de ciencias biológicas IPN. México 1996: 50-55.
22. Guevara I, Iwanejko J, Dembi A, Pankiewicz J,Determination of nitrite / nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. Department of clinical Biochemistry, collegium Medicum. Poland;22 June 1998. volumen 274, Pages 177-188.

16. ANEXO

1. Hemoglobina.

- Recolectar la sangre con anticoagulante, homogenizando perfectamente.
- Colocar 5 mL del reactivo diluyente de Drabkin en tubo de ensayo 13 X 100 mm.
- Llenar la pipeta de Sahlí con la muestra de sangre venosa hasta la marca de 0.02 mL (20 μ L). Limpiar la sangrea adherida al exterior de la pipeta de Sahli.
- Descargar el contenido de la pipeta de Salí en los 5 mL de la solución diluyente de Drabkin, enjuagando la pipeta ahí mismo, la dilución es de 1:251.
- Dejar reposar la mezcla durante 10 minutos para que la conversión de la hemoglobina en cianometahemoglobina sea total.
- Colocar la solución de cianometahemoglobina en las celdas espectrofotométricas.
- Medir la absorbancia de la solución de cianometahemoglobina, usando la solución diluyente de Drabkin como blanco y leyendo a 540 nm.
- $\text{Conc. de Hemoglobina (g/100 mL)} = \frac{(\text{Absorbancia X}) (\text{Conc. Estándar})}{\text{Abs. Estándar}}$

2. Activación del cadmio.

- Se colocó en tubos de 13 x 100 limpios, 0.5 g de cadmio metálico en la campana de extracción.
- El cadmio se plateó con una solución acuosa de Cu SO_4 al 5% (2 mL), se puso en agitación en un rocker por 10 minutos hasta que el cadmio se plateó.
- Se lavo exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, 3 lavados con el tubo lleno y después se lavo con H Cl 0.1 N para remover todo el Cd (OH)_2 , con el tubo lleno.
- Después se lavo el cadmio con $\text{NH}_4 \text{Cl}$ (solución acuosa al 5 %) ajustando el pH a 9 con borato de sodio, con un volumen.
- El cadmio se guardó en esta solución hasta el ensayo.