



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA ENZIMA ARGINASA EN
PLAQUETAS DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA
CRÓNICA (EPOC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO

NAYELI GORETI NIETO VELÁZQUEZ

TUTOR:

Dr. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL





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.

A mis padres:

Cuidaron de mí desde el primer momento, estuvieron cerca para levantarme cuando fuera necesario, me enseñaron a distinguir lo bueno de lo malo, me llamaron la atención, me dieron libertad para cometer errores, me enseñaron a luchar y a no rendirme ante las adversidades. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y aún quedan muchas metas por cumplir. Les debo todo lo que soy, los amo.

A mis hermanos:

Les dedico la fuerza de la vida, el sabor amargo de cada caída, el volver a levantarme con renovada fe, la fuerza del día y el encanto de la noche, las ausencias y presencias, el devenir de lo bueno, con todos sus temores y sin sabores. Sobrepongáanse con amor y entereza luego del fracaso porque son seres amados, preciados y valorados.

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 la confianza, apoyo y sus consejos:

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 su paciencia, su tiempo, sus enseñanzas y buenos consejos:

Dr. Raúl Barrera Rodríguez
Investigador en Ciencias Médicas del Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas"

Por su colaboración para la realización del presente proyecto:

QBP Patricia Román Perdomo
Encargada del Área de Laboratorio de Medicina Transfusional del Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas"

Por ser maestra, amiga y compañera en todo momento:

Dra. Yessica Dorin Torres Ramos
Investigador en Ciencias Médicas del Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), "Ismael Cosío Villegas"

Por todas las facilidades y apoyo brindado durante el desarrollo del presente proyecto:

Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas"

Por su apoyo, sus comentarios, sus consejos y su compañerismo:

Equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica Inorgánica y
Medicina Ambiental del Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas":

Dra. Martha Patricia Sierra Vargas,

M. en I.A. María Angélica Velázquez González,

M. en C. Araceli Montoya Estrada,

Martha Elena Munguía Castro,

Yolanda Arce Herrera,

M. en C. Emilio Espinoza Simón,

Biol. Kesia Maritza Jael Sierra Jiménez.

Cada uno de ustedes me hizo pasar momentos
agradables e inolvidables en el laboratorio.

Por ser mí amigo durante tantos años:

Biol. Everardo Remi Rodríguez Rodríguez

Por llegar en el momento indicado:

Arq. Eduardo Daniel Banda Escalante

ÍNDICE

Título	Página
I. Glosario	1
II. Relación de figuras	2
III. Relación de tablas	3
IV. Resumen	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Plaquetas	5
1.1.1. Descripción y función	5
1.1.2. Alteraciones plaquetarias asociadas a la EPOC	8
1.1.3. Alteraciones plaquetarias y el metabolismo del óxido nítrico	9
1.2. El óxido nítrico (NO)	9
1.2.1. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas	9
1.2.2. El óxido nítrico y la regulación de la actividad plaquetaria	13
1.2.2.1. Factores que regulan la producción de óxido nítrico en la hemostasis vascular	13
1.2.2.2. El óxido nítrico y la regulación fisiológica de la función plaquetaria	14
1.2.2.3. El óxido nítrico y los mecanismos de regulación plaquetaria	16
1.2.2.3.1. Guanilato ciclasa soluble (GC-S)	17
1.2.2.4. Acción del óxido nítrico independiente de cGMP sobre las plaquetas	20
1.2.3. El óxido nítrico en la fisiología y patología de la vía aérea	20
1.3. Las arginasas	22

1.3.1. Regulación de la expresión y la actividad de la enzima arginasa	25
1.3.1.1. Regulación por TNF α	25
1.3.1.2. Regulación por interacción con el citoesqueleto, especies reactivas de oxígeno (EROs) y lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL)	26
1.3.1.3. Regulación de la actividad por S-Nitrosación	27
1.3.1.4. Regulación durante el desarrollo	28
1.3.2. Enfermedades asociadas a un incremento en la actividad de arginasa	28
1.4. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	30
1.4.1. Definición	30
1.4.2. Epidemiología	31
1.4.3. Fisiopatología	32
1.4.3.1. Proceso inflamatorio	34
1.4.3.2. Factores de riesgo	37
1.4.4. Clasificación	38
1.5. El humo de cigarro (HC)	39
1.5.1. El humo de cigarro y la arginasa	39
2. HIPÓTESIS	41
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo general	
3.2. Objetivos particulares	
4. JUSTIFICACIÓN	42

5. MATERIAL Y MÉTODOS	43
5.1. Consideraciones éticas	43
5.2. Tipo de estudio	44
5.3. Captación de pacientes	44
5.4. Tamaño de muestra	44
5.5. Criterios de selección	44
5.5.1. Criterios de inclusión de pacientes con EPOC	45
5.5.2. Criterios de no inclusión de pacientes con EPOC	45
5.5.3. Criterios de inclusión del grupo control	45
5.5.4. Criterios de no inclusión del grupo control	45
5.6. Diseño experimental	46
5.6.1. Determinación de la concentración de plaquetas por turbidimetría	46
5.6.1.1. Preparación de muestras	46
5.6.2. Obtención de plaquetas	47
5.6.3. Preparación del lisado de plaquetas	48
5.6.4. Determinación de la concentración de plaquetas	48
5.6.5. Cuantificación de proteína	49
5.6.5.1. Fundamento	49
5.6.5.2. Determinación de proteínas en lisado de plaquetas	50
5.6.5.3. Cálculos	50
5.6.6. Actividad de la enzima arginasa	50
5.6.6.1. Fundamento	50

5.6.6.2. Determinación de la actividad de arginasa en plaquetas	51
5.6.6.3. Cálculos	52
5.7. Análisis estadístico	52
6. RESULTADOS	53
7. DISCUSIÓN	59
8. CONCLUSIONES	65
9. PERSPECTIVAS	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	81
• Anexo I. Cartas de consentimiento e informe de datos personales	82
• Anexo II. Curvas estándar	85
• Anexo III. Preparación de soluciones	88

GLOSARIO

ADMA	dimetil-arginina asimétrica
ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
cGMP	monofosfato de guanosina cíclico
NOS	óxido nítrico sintasas
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EROs	especies reactivas de oxígeno
GC-S	guanilato ciclasa soluble
cGMP	monofosfato de guanosina cíclico
GOLD	Guías de la Iniciativa Global para la EPOC (<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>)
GPIIb/IIIa	complejo glicoprotéico mas abundante en la membrana plaquetaria, pertenece a la familia de las integrinas y es el sitio de unión de diferentes proteínas adhesivas
K _{Ca}	canales de potasio dependientes de calcio
K _m	constante de Michaelis
LDL	lipoproteína de baja densidad
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal o tipo 1
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasas
O ₂ ⁻	anión superóxido
ODC	ornitina descarboxilasa
RANTES	quimiocinas (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Procesos fisiológicos y patológicos en los que las plaquetas están involucradas

Figura 2. Regulación de la actividad de NOS: arginasa, ADMA y DDAH.

Figura 3. Producción y efectos fisiológicos del NO en el microambiente plaqueta-endotelio.

Figura 4. Reacción que cataliza la enzima arginasa.

Figura 5. Utilización de L-arginina por arginasa y óxido nítrico sintasa (NOS).

Figura 6. Mecanismo propuesto de la participación de la arginasa en la inducción de la enfermedad vascular.

Figura 7. Fundamento de la cuantificación de proteínas por el método de Folin-Fenol.

Figura 8. Fundamento de la cuantificación de urea.

Figura 9. Relación del número (N°) de plaquetas (PLQ) con la turbidez (600 nm) del plasma.

Figura 10. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC (GOLD I, II, III y IV), reportada por mg de proteína.

Figura 11. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC, reportada por mg de proteína.

Figura 12. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC (GOLD I, II, III y IV), reportado por número de plaquetas (PLQ).

Figura 13. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC, reportada por número de plaquetas (PLQ).

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Mediadores de la inflamación almacenados y/o producidos por las plaquetas.

Tabla 2. Clasificación de la EPOC de acuerdo a la GOLD.

Tabla 3. Datos demográficos de los diferentes estadios de la EPOC.

RESUMEN

El consumo de cigarro es uno de los factores de riesgo para desarrollar Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Los efectos nocivos del tabaquismo son muy diversos; uno de ellos, se relaciona con alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico (NO), un monóxido de nitrógeno que se forma enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina y que participa en una gran diversidad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Los sistemas enzimáticos que forman NO se conocen como óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés) y comprenden tres isoenzimas: neuronal (nNOS o tipo 1), inducible (iNOS o tipo 2) y endotelial (eNOS o tipo 3), las cuales poseen varios mecanismos que controlan su actividad. Uno de estos mecanismos es la regulación de la actividad de la enzima arginasa, misma que compite con las NOS por el sustrato L-arginina. La arginasa hidroliza la L-arginina en L-ornitina y urea; y un incremento en su actividad conduce a la alteración de la actividad de las NOS (condición conocida internacionalmente como “uncoupling”) y también a la disminución de la producción de NO y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).

Los pacientes con EPOC presentan eventos trombóticos ocasionados por hiperactividad plaquetaria que agravan su condición. En el presente estudio se cuantificó la actividad de la enzima arginasa en plaquetas de pacientes con EPOC, mostrándose un incremento en la misma, lo cual puede alterar la producción de NO y con ello, contribuir en la hiperreactividad plaquetaria de estos pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLAQUETAS

1.1.1. Descripción y función

Las plaquetas son células sanguíneas anucleadas de 1-3 μm de diámetro, con una membrana celular que se invagina formando los llamados sistemas canicular abierto y el sistema tubular denso. El primero, constituye una serie de canales abiertos hacia el espacio exterior, los cuales 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 (célula a partir de la cual se forman las plaquetas) y constituye el sitio principal de almacenamiento de calcio (Ca^{2+}). 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. 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 Ca^{2+} ; mientras que los llamados gránulos α (los más numerosos), contienen sustancias vasoactivas y diversas proteínas, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), β -tromboglobulina (β -TG), fibrinógeno, los factores de coagulación V y VIII y proteínas de adhesión. (Guzmán AM et al., 2005)

Las plaquetas también participan en el proceso inflamatorio, ya que representan una fuente importante de mediadores de este proceso. El número de moléculas secretadas por las plaquetas es extenso e incluyen a una amplia gama de factores que intervienen en diversas asociaciones intercelulares: en la quimiotaxis, angiogénesis, degradación de la matriz extracelular y en diversos eventos de señalización en células blanco (células epiteliales, fibroblastos) (tabla 1). Las plaquetas liberan estos factores a través de gránulos de almacenamiento, la síntesis de eicosanoides y fosfolípidos y, como se ha observado recientemente, la traducción de RNAs mensajeros. (Weyrich AS, et al., 2003; Gear AR, Carmerini D. 2003)

Tabla 1. Mediadores de la inflamación almacenados y/o producidos por las plaquetas.

(Weyrich AS, et al., 2003; Gear AR, Carmerini D. 2003)

Quimiocinas	RANTES (CCL5), ENA-78 (CXCL5), MIP-1 α (CCL3) y PF4 (CXCL4)
Lípidos pro-inflamatorios	Ácido araquidónico, Tromboxanos, Factor activador de plaquetas (PAF)
Factores pro-angiogénicos	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) Angiopietina-1 Factor de crecimiento epidermal (EGF) Factor de crecimiento insulinoide-1 y 2 (IGF-1 y 2) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) Timosina β_4
Factores inhibidores de la angiogénesis	PF4 Trombospondina (TSP-1) Factor de crecimiento transformante- β_1 (TGF- β_1)
Metaloproteinasas	MMP-1 y MMP-2

Las plaquetas son una de las primeras células que se acumulan en los sitios de daño tisular, liberan factores que inician una cascada inflamatoria que atrae a leucocitos, activa células blanco (células epiteliales, fibroblastos) y estimula el crecimiento y reparación del vaso dañado. Entre los factores inflamatorios producidos por las plaquetas activadas, se encuentran varios tipos de quimiocinas, que incluyen a las RANTES (CCL5), ENA-78 (CXCL5), MIP-1 α (CCL3) y PF4 (CXCL4), las cuales se consideran como unas de las más potentes moléculas de señalización secretadas por las plaquetas. Las RANTES se pueden unir al endotelio y formar un puente entre células mononucleares y la pared vascular en los sitios de daño; además, también pueden mediar la activación de la expresión de genes en leucocitos que participan en el control del proceso inflamatorio. La quimiocina ENA-78, induce modificaciones en las integrinas β_2 para aumentar la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial. La quimiocina MIP-1 α , es un potente mediador de la inflamación inducida por virus y la PF-4 facilita la formación de nuevos macrófagos durante el proceso inflamatorio. (Gear AR, Carmerini D. 2003)

Todas estas características de las plaquetas hacen posible que, adicionalmente a su participación en la hemostasis vascular, también intervengan en otros procesos importantes como la remodelación tisular y los mecanismos de defensa innata; vinculándolas de esta manera con diversas enfermedades, tales como la enfermedad cardiovascular, la aterosclerosis, la diabetes, el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (figura 1). (Guzmán AM et al., 2005)

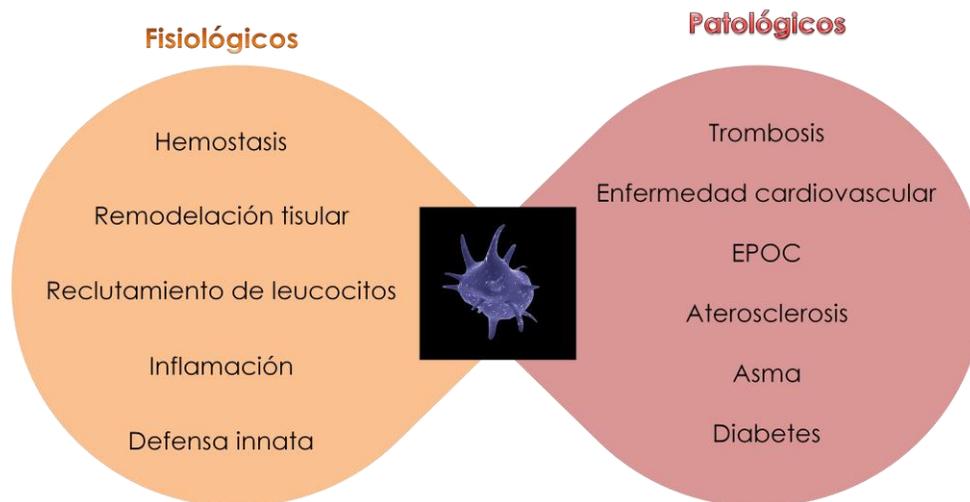


Figura 1. Procesos fisiológicos y patológicos en los que las plaquetas están involucradas.

(Guzmán AM et al., 2005)

1.1.2. Alteraciones plaquetarias asociadas a la EPOC

La historia clínica de pacientes con EPOC, muestra que un porcentaje de ellos (28% aproximadamente) desarrollan complicaciones por eventos trombóticos en los vasos sanguíneos pulmonares; porcentaje que es mucho mayor cuando la EPOC está asociada a enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos responsables de esta asociación se desconocen, sin embargo, dos grupos de investigadores han vinculado a la trombosis de pacientes con EPOC con un estado de hiperactivación plaquetaria.^(Basili S, et al., 1996) Estudios posteriores de este mismo grupo, con el propósito de estudiar la actividad plaquetaria *in vivo* en pacientes con EPOC, encontraron que algunas moléculas de origen plaquetario (y marcadoras de la actividad plaquetaria), tales como el deshidro-11-Tromboxano B₂ (principal metabolito del tromboxano A₂ en orina) y la P-selectina soluble en plasma sanguíneo, se encuentran elevadas.^(Ferroni P, et al., 2000)

1.1.3. Alteraciones plaquetarias y el metabolismo del óxido nítrico

Es posible que las alteraciones plaquetarias relacionadas con la EPOC, involucren una falla en la regulación de la actividad de estas células por parte del óxido nítrico (NO). Actualmente se sabe que el NO (antes conocido como el factor relajante derivado del endotelio, EDRF), es sintetizado por varias isoenzimas conocidas como las óxido nítrico sintasas (NOS).^(Radomski MV, et al., 1990) El NO regula una gran diversidad de funciones, entre las que destaca la de inhibir la agregación y el reclutamiento de las plaquetas.^(Freedman JE, et al., 1997) En pacientes fumadores, se ha demostrado la existencia de un estado de hiperagregabilidad plaquetaria *in vitro*, debida al menos en parte, a una disminución en la formación de NO por parte de las plaquetas, o a su inactivación por una excesiva producción de O_2^- en dichos pacientes.^(Takajo Y et al., 2001)

1.2. EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)

1.2.1. El óxido nítrico y las óxido nítrico sintasas

El NO es un gas producido por los seres vivos a partir del aminoácido L-arginina (L-arg), mediante un proceso que requiere de los cofactores NADPH y tetrahidrobiopterina. Los sistemas enzimáticos responsables de la formación de este gas se conocen como óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés). En la vía aérea, el NO es producido por tres isoenzimas de las NOS, las cuales se encuentran presentes en diversos tipos celulares: nNOS (neuronal o tipo 1) se encuentra en diversas fibras nerviosas presentes tanto en el músculo liso de la vía aérea, donde el NO es el principal mediador de la relajación neural del músculo liso, como también alrededor de glándulas submucosas, iNOS (inducible o tipo 2)

y la eNOS (endotelial o tipo 3) se expresa en los epitelios bronquial, alveolar y de la mucosa nasal; las cuales, a excepción de iNOS, son enzimas constitutivas y dependientes de calcio. Las NOS están presentes no sólo en el endotelio vascular, sino en una gran variedad de tejidos y células, incluyendo a las plaquetas. (Griffith *et al*, 1995)

El papel fisiológico inicialmente adscrito al NO fue el de ser uno de los factores relajantes vasculares derivado del endotelio vascular; sin embargo, actualmente se sabe que esta molécula participa, en ocasiones a manera de segundo mensajero (como en el caso de la vaso relajación del músculo liso inducida por acetil colina), en una gran diversidad de funciones, tales como neurotransmisión y plasticidad del sistema nervioso, control de la agregación plaquetaria, mediador del sistema inmune y de la actividad antimicrobiana, entre otros. Es importante señalar que gran parte de las acciones biológicas que el NO tiene, son mediadas a través del segundo mensajero GMP cíclico (cGMP). (Bredt *et al*, 1994) Si bien este mecanismo es el más conocido, existen otros efectos del NO que son dependientes de la formación y acción de diversos S-nitrosotioles (RSNO).

La actividad de las NOS constitutivas (eNOS y nNOS) está regulada no solamente por las concentraciones de calcio intracelular libre (Ca_i^{2+}), sino también por varios mecanismos adicionales, tales como la unión covalente (esterificación) de los ácidos grasos palmítico y mirístico, y por las reacciones de fosforilación y des-fosforilación en residuos específicos de serina (S-1179) y de treonina (T-497) de la eNOS. Otro mecanismo de regulación, lo constituye la disponibilidad de tetrahidrobiopterina (uno de sus cofactores), y de su sustrato L-arginina. La disponibilidad deficiente de estas moléculas, puede inducir una condición de "NOS

disfuncional” o “NOS desacoplada”, caracterizada por una disminución en la síntesis de NO con la concomitante formación de O_2^- e incluso de peroxinitrito ($ONOO^-$); es decir, en condiciones en que la disponibilidad de L-arginina es reducida, las NOS se comportan como NADPH oxidasa (formadora de O_2^-) o como peroxinitrito sintasa, respectivamente. (Weaver *et al*, 2005)

La L-arginina es un aminoácido que, desde el punto de vista nutricional, es semi-esencial, ya que en los mamíferos adultos puede ser sintetizado por medio del ciclo de la urea en el hígado, y de ahí se transporta al resto del organismo. La concentración intracelular de este aminoácido está regulada fundamentalmente, tanto por su transporte desde el medio extracelular (proceso en el cual participa un tipo de transportadores de aminoácidos catiónicos conocidos como CAT-1 ó γ^+), como por la actividad de la enzima arginasa (EC: 3.5.3.1), la cual lo transforma en urea y L-ornitina. Otro mecanismo que interviene en la regulación de las actividades de las NOS, lo constituye las variaciones en las concentraciones intracelulares de un inhibidor endógeno de las tres NOS: la dimetil-arginina asimétrica (ADMA, por sus siglas en inglés). Este inhibidor es un derivado metilado de la L-arginina, y se forma por la actividad de un tipo de enzimas conocidas como protein-arginina metil transferasas (PRMT). Las PRMT incorporan uno o dos grupos metilos en residuos de arginina presentes en diversas proteínas, las cuales después de ser hidrolizadas por enzimas proteolíticas en los aminoácidos que las constituyen, liberan a las argininas dimetiladas y monometiladas, ADMA y N^G -MMA, respectivamente. (Vallance *et al*, 2004)

El inhibidor ADMA no sólo disminuye la formación de NO, sino que también induce el desacoplamiento de las NOS y consecuentemente, el aumento en la

producción de $O_2^{\cdot-}$ y $ONOO^-$, contribuyendo de esta manera, al posible establecimiento del estrés oxidativo. Adicionalmente, las concentraciones de ADMA también son reguladas por la actividad de otra enzima conocida como Dimetilarginina-dimetilamino hidrolasa (DDAH). Esta enzima libera dimetilamina (DA) y forma L-citrulina a partir de ADMA (figura 2).

Actualmente se conoce que los mecanismos de regulación de las actividades de las NOS constitutivas son más bien complejos y que las actividades de las enzimas arginasa y DDAH, son elementos que recientemente se han reconocido como integrantes importantes de estos intrincados mecanismos de regulación de la producción de NO, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

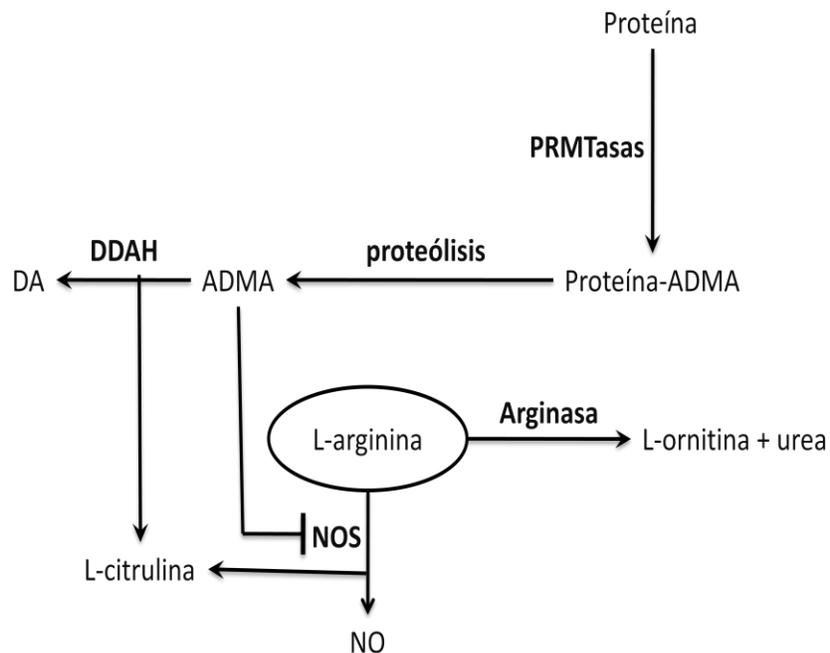


Figura 2. Regulación de la actividad de NOS: arginasa, ADMA y DDAH.

1.2.2. El óxido nítrico y la regulación de la actividad plaquetaria

1.2.2.1. Factores que regulan la producción de óxido nítrico en la hemostasis vascular

Las condiciones reológicas (hemodinámicas), que fuerzan a las plaquetas a circular más próximas a la periferia del vaso favoreciendo la interacción plaqueta-endotelio, facilitan la regulación de la función plaquetaria por medio del NO producido por las NOS del endotelio (figura 3) (Radomski and Radomski, 1999). Por otra parte, la geometría de los eritrocitos promueve el movimiento irregular de éstos en el flujo sanguíneo, facilitando la colisión de los mismos con las plaquetas, y el que se establezca un movimiento radial de las mismas en dirección a las paredes del vaso sanguíneo; efecto conocido como difusividad plaquetaria. Los eritrocitos, que circulan en la parte axial del lumen vascular, contienen hemoglobina, uno de los inhibidores más efectivos *in vitro* del NO.

La estimulación de la plaqueta y de la función endotelial tiene por lo tanto un papel importante en la generación de NO, aunque las plaquetas inactivas también generan pequeñas cantidades de NO. (Zhou et al., 1995) La liberación tónica (constante) de NO proveniente de las células endoteliales pareciera estar mediada por la fuerza de roce ("*shear stress*") del flujo sanguíneo. (Busse R, Fleming I, 1998)

El sustrato de las NOS, L-arginina, está presente en altas concentraciones (en muchas ocasiones rebasan la K_m de las NOS) en los medios extracelular e intracelular, así que en condiciones de reposo, la concentración de L-arginina no es un factor limitante para la producción de NO. En contraste, la activación endotelial y plaquetaria (adhesión-agregación), conducen a la estimulación de las

NOS y, por lo tanto, a la producción de grandes cantidades de NO. (Bode-Boger et al., 1998)

La eNOS (plaquetaria y endotelial) es dependiente de NADPH, biopterina, flavina (Salas E et al., 1997; Berkels et al., 1997) y de la disponibilidad de calcio, ya que la ausencia de este inhibe la actividad de la enzima. (Radomski et al., 1990)

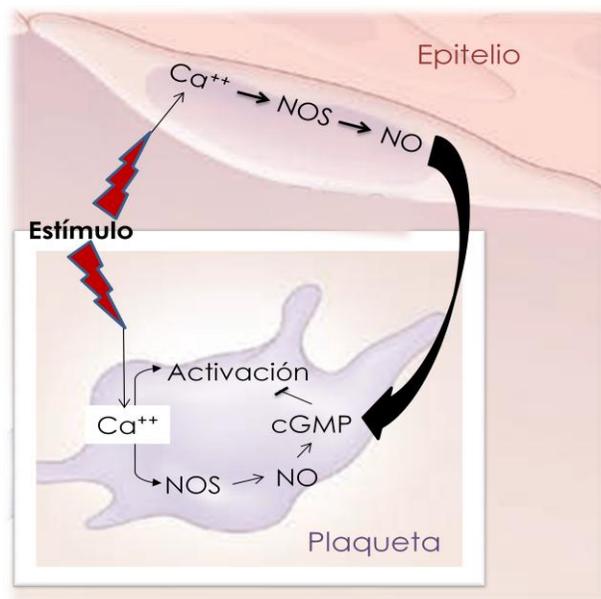


Figura 3. Producción y efectos fisiológicos del NO en el microambiente plaqueta-endotelio.

(Jurasz P, et al., 2000)

1.2.2.2. El óxido nítrico y la regulación fisiológica de la función plaquetaria

Los efectos del NO en la adhesión y la agregación plaquetaria *in vitro* aún están en estudio. No obstante la liberación basal y agonista-estimulada de NO está relacionada con la regulación plaquetaria. También la vasculatura de pulmón y la

coronaria generan NO para inhibir la adhesión plaquetaria bajo condiciones de flujo constante ^(Venturini et al., 1989; Pohl U, Busse R, 1989). La velocidad del flujo sanguíneo, determina el número de plaquetas que pasa por un determinado punto del árbol vascular, y también, el tiempo de que disponen las plaquetas para interactuar con el endotelio, y la fuerza y frecuencia de esta interacción; también condiciona las colisiones de las plaquetas entre sí, y con otros elementos sanguíneos. De la misma manera, las células endoteliales estimuladas por bradicinina liberan NO en cantidades suficientes para inhibir la adhesión plaquetaria ^(Sneddon JM, Vane JR, 1988).

La agregación plaquetaria es inducida por varios agonistas, tales como la fuerza de roce/rozamiento cizallamiento, y es inhibida por la liberación de NO de las células endoteliales ^(Broekman et al., 1991). Sumado a la inhibición de los procesos de adhesión-agregación, el NO disgrega los trombos preformados de plaquetas ^(Radomski et al., 1987) e inhibe el reclutamiento de las mismas, desfavoreciendo el crecimiento del trombo ^(Freedman et al., 1997).

El NO es un regulador importante de la función plaquetaria *in vivo*. Los estudios en animales muestran que la liberación basal o estimulada de NO conlleva a la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por algunos agentes de agregación o por una lesión endotelial ^(Houston DS, Buchanan MR, 1994). Los estudios en humanos evidencian que hay una liberación basal de NO al lumen vascular, provocando un incremento en los niveles de cGMP intraplaquetario ^(Andrews R et al., 1994). En voluntarios sanos, la inhibición de las NOS con N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) incrementa la agregación plaquetaria *ex vivo* ^(Bodzenta-Lukaszyk A et al., 1994) y acorta el tiempo de sangría ^(Simon et al., 1995). En contraste con la L-NMMA, la administración de L-arginina *in vivo* lleva a la inhibición de la activación plaquetaria

ex vivo (Bode-Boger et al., 1998). Los efectos vasodilatador (Houston DS, Buchanan MR, 1994) e inhibidor plaquetario (Bode-Boger et al., 1998) contribuyen a la acción hemostática del NO.

La activación plaquetaria y la formación de trombos ocurren como resultado de interacciones sinérgicas entre agentes proagregantes. Estas interacciones sinérgicas también se dan entre agentes que inhiben la agregación plaquetaria. Las células endoteliales producen y liberan NO y prostaciclina (prostaglandina I₂, PGI₂), moléculas antitrombóticas que actúan de manera simultánea para maximizar el alcance de la inhibición plaquetaria y la protección de la pared de los vasos (Radomski and Moncada, 1991). Interacciones sinérgicas similares ocurren entre el NO y otros inhibidores de la activación plaquetaria. La importancia biológica de la regulación sinérgica de la función plaquetaria es el asegurar el control del proceso y minimizar el impacto de las alteraciones patológicas en la hemostasis.

1.2.2.3. El óxido nítrico y los mecanismos de regulación plaquetaria

Los niveles de calcio en el citoplasma de las plaquetas, se encuentran regulados por la concentración de cAMP y de cGMP en la célula, de tal forma que ante el estímulo de algunas prostaglandinas (PGI₂, PGE₁, PGD₂) se activa la adenilato ciclasa e incrementa la concentración de cAMP, produciendo un aumento del calcio intracelular. Si el estímulo es por NO, la enzima activada será la guanilato ciclasa (GC), que inducirá un aumento de cGMP y también consecuentemente un incremento del calcio intracelular.

Al igual que en muchos otros sistemas celulares y tisulares, los efectos del NO en las plaquetas dependen en gran parte de la estimulación de la guanilato

ciclase soluble (GC-S) y el incremento resultante en los niveles de cGMP intraplaquetario. Sin embargo, algunos de los efectos del NO en las plaquetas también pueden ser independientes de la activación de la GC-S. (Irwin C et al., 2009)

1.2.2.3.1. Guanilato ciclase soluble (GC-S)

El NO activa la GC-S uniéndose al grupo hemo de la enzima. De la unión del NO con la GC-S resulta la conversión de guanosina 5'-trifosfato en cGMP. (Mellion et al., 1981) Las fracciones plaquetarias que contienen GC-S fácilmente secuestran el NO. (Liu et al., 1993)

Para estudiar el papel del GC-S en la mediación de los efectos fisiológicos del NO en las plaquetas ha sido utilizado el 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ), que es un inhibidor potente y selectivo del GC-S (Martínez-Cuesta MA, Radomski MW, 1998). Utilizando este compuesto, se mostró que los efectos de antiagregación e inhibición de la adhesión *in vitro* son sensibles a la inhibición por ODQ, por lo tanto son dependientes de cGMP.

Tres proteínas intervienen en la acción del cGMP en las plaquetas, la proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG), la cAMP fosfodiesterasa y los canales iónicos regulados por cGMP (Walter, 1989). La estimulación de la PKG conlleva a la fosforilación de proteínas como la fosfoproteína estimuladora de la vasodilatación (VASP) (Haffner et al., 1995). Durante la adhesión plaquetaria la VASP se asocia con los filamentos de actina y con las uniones transmembranales entre los microfilamentos y la matriz extracelular (Reinhard et al., 1992). La unión de la VASP con el citoesqueleto plaquetario provoca la inhibición del receptor de fibrinógeno (complejo GPIIb/IIIa) (Horstrup et al., 1994). El complejo GPIIb/IIIa juega un importante

papel en los procesos de agregación plaquetaria, cuando el fibrinógeno se une al GPIIb/IIIa de las plaquetas activadas, forma un puente entre ellas, favoreciendo la agregación de las mismas. Ésta interacción receptor-fibrinógeno, requiere de la presencia de concentraciones micromolares (μM) de calcio extracelular, que son necesarias para la formación del complejo heterodimérico de las glicoproteínas. El cGMP es un mediador en la fosforilación del carboxilo terminal del receptor de tromboxano (Wang et al., 1998). Si el receptor de tromboxano es fosforilado por la PKG, se corta la unión del receptor con la proteína G e inhibe la agregación plaquetaria mediada por tromboxano (TXA_2).

Los sitios de unión entre el receptor y el inductor plaquetario, son los dominios extracelular y transmembranal. El dominio citosólico interacciona con enzimas que van a dar lugar a la formación de segundos mensajeros, y con los canales de iones, cuyas actividades vienen reguladas por la ocupación del receptor; en este proceso se requiere la intervención de las proteínas G, que median la interacción entre los receptores y los efectores citosólicos para la generación de segundos mensajeros.

El TXA_2 generado a través de estímulos que activan las fosfolipasas al unirse a su receptor plaquetario, refuerza la acción agregante del estímulo inicial. El TXA_2 a través de su receptor, induce la movilización del Ca^{2+} intraplaquetario.

El GMP cíclico también puede interferir con el transporte de aminas en las plaquetas. La fosforilación de proteínas inducida por cGMP puede regular negativamente absorción de serotonina por las plaquetas (Launay et al., 1994). La serotonina se encuentra contenida en los gránulos densos de la plaqueta, es

liberada al medio extracelular por la activación plaquetaria y tiene efectos vasoactivos, es por esto que produce contracción en las arterias dañadas.

El cGMP disminuye las concentraciones basales y estimuladas de Ca^{2+} intracelular (Johansson and Haynes, 1992). En las plaquetas se han identificado algunos sistemas de intercambio de Ca^{2+} . Estos incluyen; los canales activados por ligando, las bombas de expulsión ATPasa de Ca^{2+} , el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, las bombas ATPasa del sistema tubular denso acumuladoras de Ca^{2+} y los canales de Ca^{2+} de transporte pasivo y receptor dependiente en el sistema tubular denso. El cGMP incrementa la actividad de las bombas de expulsión ATPasa de Ca^{2+} y el transporte a través de la membrana plasmática (Johansson and Haynes, 1992). Aunado a esto, el cGMP causa la inhibición de la movilización de Ca^{2+} , contenido en los almacenes intraplaquetarios, incluyendo el sistema tubular denso (Nakashima S et al., 1986). Los efectos del cGMP llevan al decremento de la disponibilidad de Ca^{2+} dentro y en la vecindad proximal de las plaquetas.

El cGMP regula negativamente la función de algunos receptores plaquetarios, incluyendo el receptor de fibrinógeno IIb/IIIa; y éste a su vez regula negativamente la expresión de P-selectina inducida por la proteincinasa C (PKC) y la liberación de la proteína lisosomal CD63 (proteína de membrana integral del lisosoma) (Michelson et al., 1996). Es interesante que los receptores del factor de von Willebrand (FvW) y de fibronectina, glicoproteínas Ib y Ic respectivamente, aparentemente no están regulados por cGMP. (Michelson et al., 1996)

1.2.2.4. Acción del óxido nítrico independiente de cGMP sobre las plaquetas

Algunos autores sugieren que no todas las acciones del NO sobre las plaquetas son dependientes de la generación de cGMP. Estas pueden ser acciones directas del NO sobre el flujo de calcio ^(Menshikov et al., 1993), el metabolismo (vía inhibición de la ribosilación de ADP ^(Brune and Lapetina, 1989)) y la inhibición de la 12-lipoxigenasa (enzima que da inicio a la oxigenación de ácido araquidónico) ^(Nakatsuka and Osawa, 1994). Entre los lípidos de la membrana plaquetaria, el ácido graso más representado es el ácido araquidónico (AA). Tanto el AA como sus metabolitos presentan propiedades pro y antiagregantes mediadas por receptores específicos.

Se ha sugerido que algunos compuestos donadores de NO, tales como el S-nitrosoglutatión (GSNO), pueden inhibir la función plaquetaria de ambas formas, tanto dependiente como independiente de cGMP ^(Gordge et al., 1998). Las acciones del GSNO independientes de cGMP podrían involucrar reacciones dependientes de la presencia de tioles y cobre.

Las acciones biológicas del cGMP son concluidas por la cGMP fosfodiesterasa y por su eflujo de las plaquetas; y también pueden depender de la actividad de las proteínas fosfatasas. ^(Walter, 1989)

1.2.3. El óxido nítrico en la fisiología y patología de la vía aérea

Desde principio de los 90's se tuvieron las primeras evidencias de la participación del NO en la fisiología y patología respiratorias, al encontrarse que la inhalación de este gas inducía relajación vascular pulmonar ^(Pepke-Zaba et al, 1991) y que el NO no sólo se encontraba presente en el aire exhalado de personas sanas, sino que era mayor en el caso de individuos con asma. ^(Kharitonov et al, 1994)

Actualmente se conoce que la actividad del músculo liso de las vías aéreas está controlado por diversos sistemas neuronales, incluyendo a los colinérgico, adrenérgico, y a los no-colinérgico no-adrenérgico (NANC o nitrérgico). Este último consta del NANC excitatorio (eNANC) que interviene en la contracción bronquial y del NANC inhibitorio (iNANC) el cual participa en su relajación. La importancia del NO como bronco relajante neuronal, radica en que actúa como neurotransmisor relajante, por medio del sistema iNANC, involucrando el aumento en la concentración de cGMP y la activación tanto de la PKG como de los canales de potasio dependientes de calcio (K_{Ca}).^(Ricciardolo FL et al, 2004) Adicionalmente, la nNOS también se encuentra en células no neuronales, como en diversos epitelios, al menos en la rata y el cobayo. Las células donde se ha establecido la presencia de iNOS en la vía aérea, incluyen células epiteliales alveolares, fibroblastos pulmonares, músculo liso alveolar y vascular, mastocitos y neutrófilos.^(Asano et al, 1994) La expresión de la isoenzima iNOS en las vías aéreas puede lograrse por diversos estímulos, tanto por mediadores endógenos (quimiocinas y citocinas) como por exógenos, tales como toxinas bacterianas, infecciones virales, alérgenos, hipoxia, tumores y contaminantes del aire.^(Asano et al, 1994)

Existen varios estudios en modelos animales de asma^(Samb A et al, 2001) y en pacientes con esta enfermedad^(Silkoff PE et al, 2000), que indican que la deficiencia en la producción de NO por parte de las NOS constitutivas forma parte importante de la fisiopatología de esta enfermedad, y que esta deficiencia puede deberse a una disminución en la biodisponibilidad de L-arginina. Luego, en el asma tenemos por un lado, una excesiva producción de NO producto de iNOS y por el otro, una disminución en la producción de NO por las cNOS.

1.3. LAS ARGINASAS

La enzima arginasa (L-arginina: amidino hidrolasa, EC: 3.5.3.1), hidroliza el grupo amidino de la L-arginina, formando L-ornitina y urea (figura 4). Esta enzima es ampliamente conocida como integrante del ciclo de la urea, la vía metabólica cíclica cuyo papel fisiológico en el hígado de los animales urotélicos, es el de transformar el potencialmente tóxico amonio producto del catabolismo de los aminoácidos, en urea; sin embargo, la arginasa también se expresa en diversos tejidos y órganos extra hepáticos, tales como el endotelio vascular y el pulmón.

Figura 4. Reacción que cataliza la enzima arginasa.

La arginasa existe en 2 isoenzimas, la arginasa I y la II, codificadas por genes diferentes ambas homotriméricas, que presentan una homología del 60% y son dependientes de manganeso. La arginasa I se localiza en el citoplasma fundamentalmente de las células hepáticas, aunque también en el de otros tipos celulares y constituye la isoenzima no sólo más abundante en el hígado, sino de todo el organismo, mientras que la arginasa II se encuentra asociada a la membrana externa de las mitocondrias ^(Nissim., et al, 2005) de diversos tipos celulares incluyendo a los hepatocitos, pero sobre todo, expresada en las de tejidos extra hepáticos. ^(Jenkinson CP et al, 1996) En la vía aérea, ambas isoenzimas se expresan en

diversos tipos celulares, tales como células epiteliales bronquiales, células de endotelio vascular, miofibroblastos, macrófagos alveolares y células de músculo liso. (Zuyderduyn S *et al.*, 2006)

El significado fisiológico que se ha atribuido a las arginasas extra-hepáticas, ha sido el de participar en la regulación de la síntesis de NO y de los procesos de proliferación y remodelación celulares (figura 5). Esto se debe a que las arginasas, al utilizar a la arginina, disminuyen la disponibilidad de este aminoácido para la síntesis de NO por las óxido nítrico sintasas. El incremento de la actividad de estas enzimas está asociado a un gran número de condiciones patológicas. (Durante W *et al.*, 2007)

La L-arginina es sustrato de ambas: las NOS oxidan al sustrato, produciendo óxido nítrico (NO) y L-citrulina; y la arginasa hidroliza al sustrato y sintetiza L-ornitina y urea. La arginasa regula la producción de NO, ya que compete con NOS por el sustrato. Por otro lado, N^ω-hidroxi-L-arginina (NOHA), un intermediario de la síntesis de NO catalizada por NOS, inhibe la actividad de arginasa. Adicionalmente, la L-ornitina, el otro producto de las arginasas, interviene como precursor de L-prolina y de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (biomoléculas requeridas en los procesos de remodelación, reparación y proliferación celulares (Satriano, 2004)) (figura 5). El incremento en la actividad de arginasa es crítico para el control de la respuesta inflamatoria y para la reparación del tejido que se ha dañado en ella. De acuerdo con este concepto, se ha postulado que en las enfermedades inflamatorias, tales como el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, la producción del NO a partir de L-arginina

forma parte de la respuesta inicial inflamatoria, mientras que la producción de L-ornitina a partir de L-arginina se relaciona con el proceso de cicatrización.

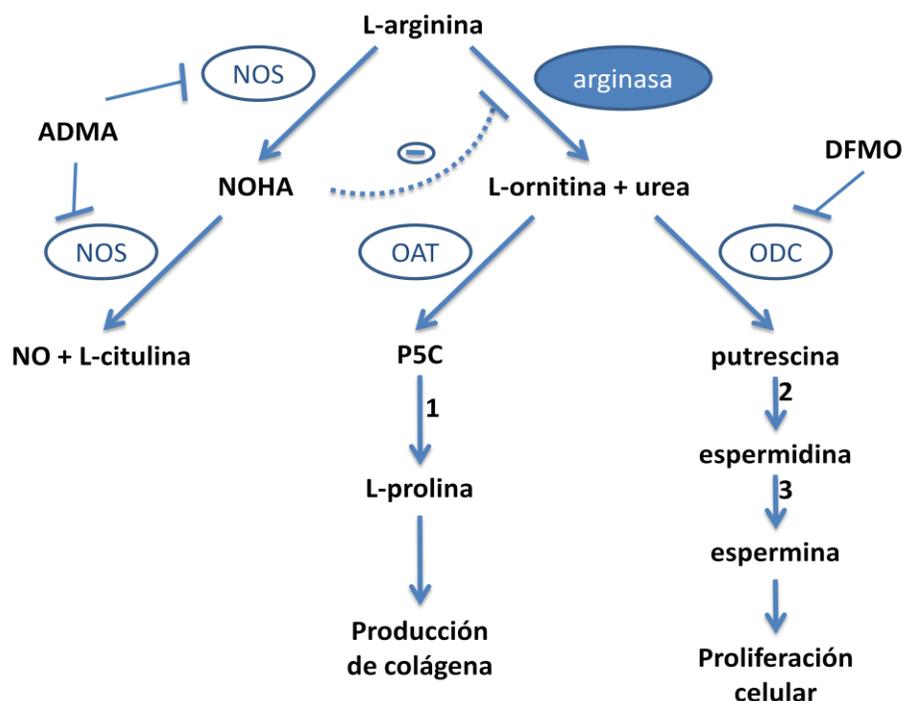


Figura 5. Utilización de L-arginina catalizado por arginasa y óxido nítrico sintasas (NOS).

DFMO α -difluorometil ornitina, **ADMA** dimetilarginina asimétrica,
OAT Ornitina aminotransferasa, **ODC** Ornitina descarboxilasa,
P5C L-pirrolina-5-carboxilato, **1** pirrolina-5-carboxilato reductasa,
2 espermidina sintasa, **3** espermina sintasa. (Maarsingh et al., 2008a)

Munder y cols en el 2006 ^(Munder M et al., 2006) documentaron que la arginasa I es liberada de los granulocitos humanos y presenta una alta actividad durante reacciones inflamatorias purulentas. La arginasa de los granulocitos humanos induce la supresión de la proliferación de las células T y síntesis de citocinas. Este efecto es debido a la disminución de L-arginina por la actividad de arginasa en el medio de las células T.

1.3.1. Regulación de la expresión y la actividad de la enzima arginasa.

1.3.1.1. Regulación por TNF α

La actividad de las arginasas extra-hepáticas se regulan tanto a nivel traduccional como postraduccional. Utilizando células endoteliales de arteria pulmonar de bovino, Nelin y cols ⁽²⁰⁰⁵⁾ demostraron que el tratamiento pro-inflamatorio de estas células con endotoxina (lipopolisacárido, LPS) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), induce la expresión y actividad de arginasas I y II, concomitantemente con la iNOS; y que a diferencia de la inducción de iNOS, las expresiones de las arginasas requerían de la actividad del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF). En células endoteliales de arterias coronarias de ratón, también se ha demostrado el efecto inductor del TNF- α en la expresión de arginasa. En este modelo animal, se ha podido establecer que durante el proceso de isquemia-reperfusión, se produce un aumento en la producción de TNF- α el cual induce la sobre-expresión de arginasa I. El aumento en la actividad de arginasa, a su vez provoca la disfunción endotelial por el incremento en la producción de O₂⁻ asociado al desacoplamiento de la eNOS. ^(Gao X et al., 2007) El aumento en la expresión de arginasa también se ha asociado al daño inducido durante el proceso de isquemia-reperfusión en el hígado. ^(Reid KM et al., 2007)

1.3.1.2. Regulación por interacción con el citoesqueleto, especies reactivas de oxígeno (EROs) y lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL).

Otro mecanismo de regulación de la actividad de arginasa, parece ser el dependiente de la interacción de la enzima con elementos del citoesqueleto. (Jiang M et al., 2006) En células endoteliales humanas, también se ha puesto en evidencia la interacción de arginasa II con componentes del citoesqueleto como los microtúbulos; en este caso, la asociación induce disminución de la actividad mientras que su disociación provoca la activación. Uno de los factores que puede inducir la disociación de la arginasa II de los microtúbulos y consecuentemente su activación, es la ox-LDL. (Ryoo S et al., 2008) La ox-LDL es un factor pro-aterogénico que se forma en condiciones de estrés oxidativo y que induce disfunción endotelial dependiente de una disminución en la producción de NO. Las evidencias indican un fuerte vínculo entre la activación de la arginasa II por la ox-LDL y el proceso de aterogénesis, lo cual a conducido a la propuesta de la inhibición de esta enzima como una posible terapia farmacológica para la aterosclerosis. (Ryoo S et al., 2006) En endotelio de arterias coronarias de porcino, también se ha mostrado un incremento en la actividad de arginasa vinculado con estrés oxidativo. (Thengchaisri N et al., 2006) En ese estudio, se determinó que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce un aumento en la expresión y la actividad de arginasa I, concomitantemente con una disminución en la relajación vascular dependiente de NO. Este hallazgo sugiere que el H_2O_2 , específicamente interfiere con la vaso relajación dependiente del NO endotelial, a través de un mecanismo que involucra la reducción de la

disponibilidad de L-arginina para la formación de NO debida a una elevada actividad de la enzima arginasa I.

1.3.1.3. Regulación de la actividad por S-Nitrosación.

Los S-nitrosotioles (SNO) son productos que se forman mediante las reacciones de S-nitrosación (también conocidas como S-nitrosilación), las cuales se realizan por la reacción del NO con los grupos sulfhidrilos (SH) presentes en las proteínas (P-SH), para formar los S-nitrosotioles protéicos (P-SNO) correspondientes:



En la actualidad se reconoce que las reacciones de S-nitrosación, constituyen un mecanismo adicional de regulación de la actividad biológica de diversas proteínas, equiparable a los mecanismos bien conocidos de regulación por reacciones de fosforilación. ^(Hess DT et al., 2005) En relación con la arginasa, se ha establecido que la actividad de la enzima de endotelio vascular se encuentra incrementada en los estados de disfunción endotelial asociados al envejecimiento, debido al menos en parte, al incremento en la modificación por S-nitrosación de la enzima, dependiente de la producción de NO por iNOS. ^(Santhanam L et al., 2007) Este hecho es importante, ya que vincula causalmente la elevada expresión de iNOS que se suscita en los procesos inflamatorios, con la disfunción endotelial y la alteración en el metabolismo del NO, asociaciones que se conocen desde hace tiempo. ^(Hess DT., 2005)

1.3.1.4. Regulación durante el desarrollo.

Estudios realizados en fetos de ratas, han mostrado que tanto la expresión de arginasa II, así como la actividad total de esta enzima, se encuentran incrementadas en bronquios y arterias pulmonares, y que esta actividad y expresión disminuyen con la edad después del nacimiento. (Belik J et al., 2008)

Adicionalmente, también se encontró que la elevada resistencia arterial pulmonar característica del feto, se reduce considerablemente por la acción de un inhibidor de la arginasa (N-hidroxi-nor-L-arginina). Estos hallazgos han permitido plantear la hipótesis de que la existencia de una elevada resistencia vascular pulmonar y una baja producción de NO en pulmón durante la vida prenatal, es debida al menos en parte, a una elevada expresión y actividad de arginasa en los pulmones. (Belik J et al.,

2008) En el neonato prematuro es frecuente la existencia de hipertensión pulmonar, por lo que también es posible que exista una elevada expresión y actividad de arginasa en la vía aérea de estos pacientes.

1.3.2. Enfermedades asociadas a un incremento en la actividad de arginasa.

Como se mencionó anteriormente, la enzima arginasa, no sólo participa en el catabolismo de los aminoácidos por medio del ciclo de la urea en el hígado, sino que también tiene un papel importante en el control de la disponibilidad de L-arginina para otras vías metabólicas y en diversos tejidos extra hepáticos. Una de estas vías, es justamente hacia la síntesis de NO por las NOS; de tal manera que cuando la actividad de arginasa se encuentra incrementada (ya sea porque se encuentra sobre-expresada o activada postraduccionalmente), se disminuye la

disponibilidad de L-arginina para la síntesis de NO y se favorece la formación de especies reactivas del oxígeno y con ello, el desarrollo de la alteración conocida como estrés oxidativo. Es por esto, que actualmente se considera que diversas patologías que involucran alteraciones en el metabolismo del NO, tales como diabetes (Romero MJ *et al*, 2008; Kashyap SR *et al*, 2008), enfermedad cardiovascular (Katusic ZS *et al*, 2007), aterosclerosis (Ryoo S *et al*, 2008), anemia hemolítica falciforme (Kielstein JT *et al*, 2005), disfunción eréctil (Masuda H *et al*, 2008) y asma (Maarsingh H *et al*, 2008b; 2006), se encuentran asociadas a incrementos en la actividad de la enzima arginasa. En la circulación, la producción de NO por las NOS en las células endoteliales juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular, inhibiendo el tono vascular, la agregación plaquetaria y la inflamación. Además, la síntesis de NO mediada por iNOS en las células del músculo liso (CML) funciona como una retroalimentación negativa, al inhibir la síntesis de colágena y el crecimiento celular, y estimular su apoptosis. La arginasa puede promover ambas, la disfunción de las células endoteliales y la de las CML, ya que regula el metabolismo de la L-arginina. En particular, la habilidad de la arginasa para competir con la eNOS por el sustrato L-arginina disminuye la síntesis de NO generando disfunción endotelial. Por otro lado, la arginasa promueve la síntesis de L-ornitina y la síntesis de poliaminas y L-prolina por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) y ornitina aminotransferasa (OAT), respectivamente. La producción de poliaminas y L-prolina juegan un papel importante en la proliferación de CML y en la producción de colágena, promoviendo el desarrollo de lesiones vasculares. Los efectos de la arginasa son amplificados por la disminución de la liberación de NO, que sirve como un inhibidor del crecimiento de

las CML y de la síntesis de colágena. Por lo tanto, las poliaminas y la L-prolina también pueden estar relacionadas con otras enfermedades pulmonares en las que se presentan alteraciones en la remodelación tisular, como la fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y displasia broncopulmonar (figura 6). (Durante W et al., 2007)

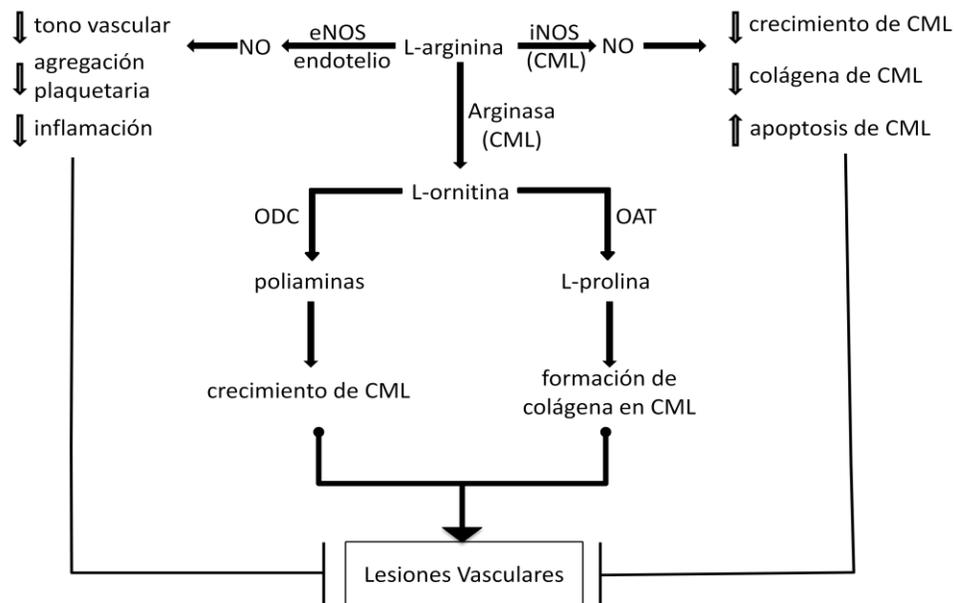


Figura 6. Mecanismo propuesto de la participación de la arginasa en la inducción de la enfermedad vascular.

CLM células de músculo liso, **ODC** ornitina descarboxilasa,

OAT ornitina amino transferasa (Durante W et al., 2007)

1.4. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

1.4.1. Definición

La EPOC comprende a la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar. Es más frecuente en mayores de 45 años y se caracteriza por obstrucción bronquial y destrucción de parénquima pulmonar en los casos de enfisema. La definición más reciente es de tipo funcional. En las Guías de la Iniciativa Global para la EPOC

(GOLD, siglas en inglés: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*), la han definido como una enfermedad caracterizada por limitación al flujo aéreo, la cual no es completamente reversible, la limitación de flujo aéreo es comúnmente progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones por la exposición a partículas nocivas o gases. (Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005)

1.4.2. Epidemiología

La EPOC ocupa los primeros lugares en morbi-mortalidad en todo el mundo. Su prevalencia mundial en personas mayores de 40 años de edad es de más del 10%. (Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005)

El incremento en la mortalidad ha sido sustancial en los últimos 30 años. En 1990 ocupaba el sexto lugar y se considera que ocupará el tercer lugar para el 2020 y en términos de morbilidad se situará del cuarto al tercer lugar a nivel mundial. (Pawel RA, Rabe KF, 2004) La causa del incremento en la morbi-mortalidad se debe principalmente a la epidemia del tabaco que estamos viviendo en todo el mundo. Además, los cambios demográficos, sobre todo en países en vías de desarrollo donde la esperanza de vida está aumentando, permitirán ensanchar el riesgo de que más personas cursen con esta enfermedad. (López AD et al., 2006)

Se sabe que 600 millones de personas padecen la enfermedad a nivel mundial y mueren prematuramente 2.75 millones al año, según estimaciones de la OMS, y las previsiones son desalentadoras para las siguientes décadas.

En la actualidad se sitúa como la cuarta causa de muerte en el mundo, únicamente después de las enfermedades coronarias, cerebrovasculares y las neoplasias, siendo una de las enfermedades de este grupo que aumenta en frecuencia.

En México como en los demás países de Latinoamérica, la EPOC, es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad, sin embargo, permanece subdiagnosticada y poco reconocida como un problema de salud pública. En nuestro país, la EPOC ocupa el 5° lugar dentro de las 10 primeras causas de mortalidad general en personas mayores de 65 años en 2005 ^(INEGI, 2005) y en la zona metropolitana de la Ciudad de México el 7.8% de la población de más de 40 años la padece. ^(Menezes AM et al., 2005)

En cuanto a la morbilidad, no existen datos específicos en nuestro país. Sin embargo, existen evidencias de que también la morbilidad es muy importante. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la EPOC ocupa el segundo lugar en visitas a urgencias, el 4° lugar como causa de egreso hospitalario y se ubicó en el 5° lugar de morbilidad y mortalidad hospitalaria en el año 2005. A pesar de todos estos datos, la EPOC permanece subdiagnosticada en nuestro país, no sólo en los estadios tempranos de la enfermedad, sino también en los tardíos.

1.4.3. Fisiopatología

La EPOC se caracteriza por inflamación crónica de la vía aérea, del parénquima pulmonar y de las arterias pulmonares. Las células y mediadores inflamatorios involucrados en ese proceso son: los macrófagos alveolares, polimorfonucleares

(PMN), linfocitos T (CD8) y células epiteliales. Entre los mediadores se encuentran: TNF- α , leucotrieno B4 (LTB4), interleucina 8 (IL-8) y el factor quimiotáctico de los neutrófilos.

En las etapas tempranas de la enfermedad puede presentarse tos con expectoración, reflejo de la disfunción ciliar e hipersecreción de moco, y al final de la enfermedad lo característico es el *cor pulmonale* (corazón pulmonar, hipertrofia de las cavidades derechas del corazón), el cual guarda una estrecha relación con el grado de hipoxemia y se asocia a un pronóstico pobre.

Además de la inflamación, otros procesos intervienen en la patogénesis, como son el desequilibrio en proteasas y antiproteasas y el estrés oxidativo. ^(Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005)

La activación de PMN y macrófagos provoca la liberación de diferentes proteasas las cuales, son responsables de la destrucción de los bronquiolos y del parénquima pulmonar. ^(Stockley RA, 1994) En condiciones normales, estas proteasas, son inhibidas por la α -1-antitripsina. En las personas que desarrollan EPOC (15-20% de los fumadores), hay una alteración o desequilibrio de este sistema provocando una mayor actividad proteolítica sobre los componentes de matriz extracelular, lo que propicia parte del daño que se le atribuye al tabaquismo. ^(Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005) Se ha encontrado que junto a la destrucción provocada por las diferentes proteasas, se encuentra la generación de un daño por estrés oxidativo. ^(Dekhuizen PN et al., 1996) Diversos estudios han reportado incrementos anormales de peróxido de hidrógeno y 8 iso-prostano en el aire exhalado y en orina de pacientes con EPOC (principalmente durante una

exacerbación). Estos productos son liberados durante la producción de daño por radicales libres, lo que a su vez incrementa la inflamación y la lesión proteolítica.

Todos estos factores provocan los cambios observados en pacientes con EPOC, como es la limitación del flujo aéreo que se observa en la enfermedad de la vía aérea pequeña y el enfisema. Aunque a la fecha no está claro por qué algunos evolucionan hacia la bronquitis y otros tienen predominantemente enfisema. Existe actualmente un debate acerca del origen de la obstrucción de la vía aérea en EPOC. Por un lado, se cree que es fundamentalmente debida a la obstrucción de lumen de la vía aérea pequeña como resultado de una bronquiolitis. Por otro lado, se piensa que la limitación del flujo aéreo se debe a la pérdida de la elasticidad y cierre de las vías aéreas pequeñas producto de la destrucción del parénquima. La pérdida de la elasticidad del pulmón puede ocurrir aun en la ausencia de enfisema y es probable que sea un factor importante para la obstrucción de la vía aérea en pacientes con EPOC. Es probable que ambos mecanismos tengan un papel en grado variable para producir limitación del flujo aéreo en la mayoría de los pacientes. (Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005)

1.4.3.1. Proceso inflamatorio

Cuando se lesiona un tejido, ya sea por la infección, traumatismo, sustancias químicas, calor u otros factores, el tejido lesionado libera múltiples sustancias que provocan cambios secundarios en los tejidos. Todo el complejo de cambios tisulares se denomina inflamación. (Guyton-Hall, 2001)

La inflamación se caracteriza por:

- i. Dilatación de los vasos sanguíneos locales, con aumento de flujo sanguíneo local.
- ii. Aumento de la permeabilidad de los capilares que permite la filtración de grandes cantidades de líquido a espacios intersticiales.
- iii. Coagulación de líquido en espacio intersticial por una cantidad excesiva de fibrinógeno y de otras proteínas que salen de los capilares.
- iv. Migración de un gran número de granulocitos y monocitos al tejido.
- v. Tumefacción de las células tisulares. Algunos productos tisulares que provocan esta reacción son la histamina, la bradicinina, la serotonina, las prostaglandinas, los diferentes productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y numerosas sustancias llamadas linfocinas que son liberadas por las células T sensibilizadas. Varias de estas sustancias activan el sistema macrofágico, y en pocas horas estas células comienzan a devorar los tejidos destruidos; a veces, los macrófagos también lesionan las células tisulares sobrevivientes. (Guyton-Hall, 2001)

Uno de los primeros resultados de la inflamación consiste en la tabicación del área de lesión, que la separa del resto de los tejidos. Los espacios tisulares y los vasos linfáticos del área inflamada se bloquean con coágulos de fibrinógeno, de forma que, poco después, el líquido apenas fluye a través de los espacios. Este proceso de tabicación retrasa la propagación de infecciones o de productos tóxicos.

El macrófago tisular constituye la primera línea de defensa contra la infección. A pocos minutos de la inflamación, los macrófagos presentes en los tejidos comienzan de inmediato las acciones fagocíticas. El primer efecto de su activación por los productos de la infección y de la inflamación, consiste en un aumento rápido del tamaño de cada una de éstas células. Después muchos de los macrófagos previamente asentados rompen sus adherencias y se tornan móviles, creando la primera línea de defensa.

La invasión de los neutrófilos al área inflamada constituye la segunda línea de defensa. En la primera hora de la inflamación, un gran número de neutrófilos empieza a invadir la zona inflamada desde la sangre, como consecuencia de los productos de los tejidos inflamados, que inician las siguientes reacciones:

- i. Alteran la superficie interna del endotelio capilar, con lo que los neutrófilos se pegan a las paredes capilares del área inflamada. Este efecto se denomina marginación, determina que las células endoteliales de los capilares y de las pequeñas vénulas se separen, formando aberturas lo bastante grandes como para que los neutrófilos pasen de la sangre a los espacios tisulares mediante diapédesis.
- ii. Otros productos de la inflamación inducen quimiotaxis de neutrófilos hacia los tejidos lesionados.

De este modo varias horas después de que empiece la lesión tisular, el área se llena de neutrófilos. Los neutrófilos sanguíneos ya son células maduras y están preparadas para comenzar de inmediato sus funciones de depuración, destrucción de bacterias y eliminación de materia extraña.

La tercera línea de defensa del tejido inflamado consiste en una segunda invasión. Junto a la invasión de los neutrófilos, los monocitos de la sangre entran en el tejido inflamado y aumentan el tamaño hasta convertirse en macrófagos. Los macrófagos pueden fagocitar mucho más bacterias y partículas mucho mayores como los propios neutrófilos y grandes cantidades de tejido necrótico.

La mayor producción de granulocitos y macrófagos por la médula ósea constituye la cuarta línea de defensa. Consiste en la producción aumentada de granulocitos y monocitos en la médula ósea. Este incremento obedece a la estimulación de las células progenitoras granulocíticas y monocíticas de la médula. Sin embargo, los granulocitos y los monocitos formados tardan de 3 a 4 días en alcanzar el estadio para abandonar la médula ósea. Si el estímulo del tejido inflamatorio continúa, la médula ósea puede seguir generando grandes cantidades de estas células durante meses e incluso años, a veces con un ritmo de producción entre 20 a 50 veces mayor de lo normal. (Guyton-Hall, 2001)

1.4.3.2. Factores de riesgo

El factor de riesgo más frecuente para la EPOC es el tabaquismo (Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005), sin embargo, en México y otros países latinoamericanos existe otro factor de riesgo que consiste en la exposición a humo de leña, sobre todo en las mujeres que viven en las áreas rurales cuya única forma de combustible es la leña. (Ramírez-Venegas A et al., 2006)

La intensidad de la exposición y la susceptibilidad genética son factores que influyen para que un sujeto adquiera la enfermedad, ya que no todos los sujetos que fuman, o los que se exponen a humo de leña van a desarrollarla. Por

supuesto que a mayor exposición el riesgo aumenta. Por ejemplo entre los fumadores, sólo un 10 a 15% presentarán la enfermedad. Y en el caso de las mujeres que están expuestas a humo de leña, un índice de exposición a humo de leña de 100h/año es riesgo para desarrollar bronquitis crónica sin obstrucción. Mientras que con 200h/año o más el riesgo de tener EPOC es 75 veces mayor que en las mujeres sin esta exposición. (Pérez-Padilla R et al., 1996)

El asma y la hiperreactividad bronquial, son factores de riesgo que se han señalado para el desarrollo de la EPOC. Las guías globales para el diagnóstico y tratamiento de la EPOC han agrupado a los factores de riesgo en los que están directamente relacionados con el huésped y los exposicionales o ambientales. (Pauwels RA et al., 2001)

1.4.4. Clasificación

El diagnóstico de la EPOC se realiza en un paciente con: a) factores de riesgo (humo de cigarro, humo de leña) b) síntomas característicos de la enfermedad (tos, expectoración y disnea), y se corrobora por c) los hallazgos de gabinete, siendo la espirometría posbroncodilatador la prueba que lo confirma.

La espirometría es un estudio de determina la presencia de obstrucción y la severidad de la misma. Los parámetros de la espirometría posbroncodilatador que deben evaluarse son: el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF_1) y la relación VEF_1 /capacidad vital forzada (VEF_1/CVF).

Si un paciente tiene esta relación VEF_1/CVF menor del 70% del predicho posbroncodilatador, se concluye que el paciente tiene EPOC. El segundo paso consiste en evaluar la severidad de la obstrucción, mediante el VEF_1

posbroncodilatador. En la tabla 2 se muestran los estadios de severidad de la EPOC (0 a IV), propuestos por las guías GOLD. (Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005)

Tabla 2. Clasificación de la EPOC de acuerdo a la GOLD

Estadios	Severidad de la EPOC	VEF ₁ /CVF %p	VEF ₁ %p
0	En riesgo	>70%p	>80%
I	Leve	<70%p	≥80%p
II	Moderado	<70%p	<80% y ≥50
III	Severo	<70%p	<50% y ≥30
IV	Muy severo	<70%p	<30% o <50% con insuficiencia respiratoria (PaO ₂ < 60 mm.Hg) y/o presencia de <i>Cor pulmonale</i>
VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo CVF: capacidad vital forzada p: predicho			

1.5. El humo de cigarro (HC)

1.5.1. El humo de cigarro y la arginasa.

Recientemente se ha venido fortaleciendo el concepto de que, varios de los efectos del humo de cigarro (HC), están vinculados a alteraciones en el metabolismo del NO, y que estos se deben a una activación y/o a un aumento en la expresión de la enzima arginasa. (Zhang WZ et al., 2006; Bergeron C et al., 2007)

El humo de cigarro estimula la proliferación celular por medio de la producción de poliaminas por la vía de la arginasa I. La nicotina, un componente importante del humo de cigarro, tiene la capacidad de incrementar la arginasa I y la expresión de la ODC. La nicotina incrementa significativamente la expresión del mRNA de la arginasa I y de la ODC en las células epiteliales de la línea celular BEAS-2B. (Bergeron C et al., 2007)

Imamura en 2007 (Imamura M et al., 2007) informó que el extracto del humo de cigarro al ser administrado de forma subcutánea en conejos machos una vez al día por cinco semanas, disminuyó significativamente la producción de cGMP (un marcador de generación de NO). Este fenómeno fue asociado con la atenuación de la actividad de las NOS constitutivas, incremento de la actividad de la enzima arginasa, acumulación de inhibidores endógenos de las NOS tales como monometilarginina (MMA) y dimetilarginina asimétrica (ADMA) y disminución de la actividad de la enzima dimetilarginina-dimetil aminohidrolasa (DDAH). También se ha demostrado que el humo del cigarro atenúa la actividad de las NOS constitutivas en el pene, así como la expresión de la nNOS sin alterar la expresión de la eNOS en la rata. (Xie Y et al., 1997)

2. HIPÓTESIS

La EPOC está asociada a un proceso inflamatorio que conduce a una mayor actividad de la enzima arginasa en las plaquetas de los pacientes que padecen esta enfermedad.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si en plaquetas de pacientes con EPOC (GOLD I, II, III y IV) existe una mayor actividad de la enzima arginasa.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Implementar un método para medir la actividad de la enzima arginasa en plaquetas.
- Comparar la actividad de la enzima arginasa en plaquetas de sujetos sanos y de pacientes ex-fumadores con EPOC.

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han mostrado que las arginasas extra-hepáticas, regulan la formación de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, al transformar la L-arginina en L-ornitina y urea. Adicionalmente, se ha documentado que muchas condiciones patológicas vinculadas a alteraciones en la formación del NO, también están asociadas a un incremento en la actividad de la enzima arginasa, disminuyéndose la disponibilidad de L-arginina para la biosíntesis de NO. La importancia de esto radica en que el NO no sólo interviene en la regulación del tono vascular, sino que también en un gran número de procesos fisiológicos, incluyendo la activación plaquetaria.

Debido a que las plaquetas participan de manera importante en los procesos inflamatorios incluyendo la EPOC, resulta importante el determinar las causas de estas alteraciones plaquetarias. Una de las posibles causas podría estar relacionada con una modificación en la actividad de la enzima arginasa en estas células.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Departamento de Bioquímica y Medicina Ambiental en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”, formando parte del proyecto con código B10-03, aprobado por el Comité de Ciencia y Bioética.

5.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En este estudio se utilizaron muestras de sangre total que fueron obtenidas cuando los pacientes se realizaron estudios de laboratorio como parte del seguimiento en su padecimiento. Por lo que este estudio se considera, según la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, como de riesgo mínimo.

Se informó al paciente que una parte de la sangre tomada en el laboratorio clínico se utilizaría para otras evaluaciones con fines de investigación por lo que se adjuntó carta de consentimiento informado (anexo I) el cuál contenía los propósitos y objetivos de la investigación, los beneficios y posibles molestias e inconvenientes de la participación del paciente y sus familiares, así como también el derecho de retirarse en cualquier momento y por cualquier motivo de la investigación, sin verse perjudicada su atención médica.

5.2. TIPO DE ESTUDIO

Tipo de investigación: Observacional Descriptivo.

Método de observación: Transversal.

Temporalidad: Prospectivo.

5.3. CAPTACIÓN DE PACIENTES

Los pacientes fueron captados con base en los criterios de selección, por medio de un muestreo de casos consecutivos que ingresaron al departamento de enfermedades de las vías aéreas y al servicio de urgencias del INER.

5.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Debido a que no hubo un estudio previamente documentado y publicado de la actividad de arginasa plaquetaria en individuos sanos, no se pudo calcular el tamaño de la muestra.

5.5. CRITERIOS DE SELECCIÓN

La selección, seguimiento e idoneidad de los pacientes y del grupo control para el estudio fue llevado a cabo por médicos Neumólogos, del servicio clínico de enfermedades de las vías aéreas del INER.

5.5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES CON EPOC

Pacientes tanto de sexo masculino como femenino, con un intervalo de edad de 50 a 75 años, con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica que cumplan los criterios internacionales para ser considerados GOLD I, II, III y IV, que radiquen en la zona metropolitana de la Ciudad de México, y que firmen el consentimiento informado.

5.5.2. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN DE PACIENTES CON EPOC

La presencia de cualquier patología activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis) y cáncer.

5.5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DEL GRUPO CONTROL

Voluntarios del sexo masculino o femenino, con un intervalo de edad de 50 a 75 años. Que las pruebas de laboratorio corroboren su buen estado de salud. Que hayan firmado el consentimiento informado.

5.5.4. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN DEL GRUPO CONTROL

Que sean fumadores activos y/o pasivos, que presenten cualquier patología activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis) y cáncer.

5.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS POR TURBIDIMETRÍA

Se utilizaron muestras de pacientes de Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Para la técnica se ocuparon un total de 6 pacientes.

5.6.1.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción y colocadas en tubos plásticos de 5 mL con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamino tetraacético).
- Los ~4 mL de sangre periférica se centrifugaron a 150 g (aceleración centrífuga relativa) durante 15 minutos y se recolectaron $\frac{3}{4}$ partes del plasma sanguíneo. Este plasma se consideró como el plasma rico en plaquetas (PRP).
- El PRP se centrifugó a 150 g durante 6 minutos. Se recolectó el sobrenadante.
- Se formaron “pool” de ~2mL de PRP.
- De cada “pool” se hicieron 5 diluciones con solución salina: 1:4, 1:2.4, 1:1.9, 1:1.5 y 1:1.2
- Se obtuvo la lectura a 600 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV) de todas las diluciones y del plasma sin diluir.
- Se hizo conteo celular de la dilución 1:4 con el coulter (Sysmex, XS-1000i para muestreo individual de tubo cerrado) (N° de células/ μ L). Con base en esto, se calculó el número de células de cada dilución.

- Un mililitro de PRP se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos, para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP).
- Se hicieron las mismas diluciones que con el PRP y se tomaron las lecturas a 600 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV).

5.6.2. OBTENCIÓN DE PLAQUETAS

Las muestras de sangre fueron obtenidas por venopunción y colocadas en tubos plásticos de 5 mL con anticoagulante EDTA 5mM (ácido etilendiamino tetraacético).

Los ~4 mL de sangre periférica fueron centrifugados a 150 g (fuerza centrífuga relativa) durante 15 minutos y se recolectó $\frac{3}{4}$ partes del plasma sanguíneo rico en plaquetas (PRP). Posteriormente se procedió de la siguiente manera:

- Centrifugar el PRP a 150 g durante 6 minutos y recolectar 1 mL del sobrenadante.
- Tomar lectura de absorbencia (Abs) del PRP a 600nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV) (turbidez).
- Centrifugar en tubo eppendorf de 1.5 mL a 1000 g durante 5 minutos.
- Recolectar el plasma pobre en plaquetas (PPP) o sobrenadante.
- Tomar lectura de As del PPP a 600nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV).
- Mantener el PPP sobre hielo o almacenar en congelación para su análisis posterior.

- Lavar el paquete de plaquetas con 1.5 mL de PBS-EDTA 1mM pH 7.2, resuspender suavemente las células.
- Centrifugar a 1000 g durante 7 minutos para recuperar el paquete de plaquetas.
- Decantar el sobrenadante.

5.6.3. PREPARACIÓN DEL LISADO DE PLAQUETAS

El volumen de lisis de las plaquetas se determinó tomando como criterio general, que dada una diferencia de 0.5 de absorbencia (*Abs PRP* – *Abs PPP*), las plaquetas se lisarían con 0.15 mL de solución lítica: TRIS-HCl 50 mM pH 7.5- PMSF 0.13 mM-Tx 100 al 0.1% (mantener a -4°C).

$$\text{Volumen de lisis } (\mu\text{L}) = \frac{(\text{Abs PRP} - \text{Abs PPP}) \times 150}{0.5}$$

5.6.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS

Con base en la curva estándar de conteo de plaquetas por turbidimetría, para determinar la concentración de plaquetas en el lisado, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{10^8 \text{ plaquetas}}{\text{mL de lisado}} = \frac{\left(\frac{N^\circ \text{ de plaquetas}}{\text{mL de plasma}} \right) \div \text{Volumen de lisis } (\mu\text{L})}{10^5}$$

5.6.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

5.6.5.1. FUNDAMENTO

Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan, cambios en la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción, donde el Cu^{2+} actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso. Lowry y colaboradores (Lowry OH et al., 1951) hicieron una modificación de esta técnica para la determinación de cantidades pequeñas de proteína del orden de 30 a 100 μg con una precipitación de $\pm 10\%$.

5.6.5.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL LISADO DE PLAQUETAS

Tubo	Lisado de plaquetas (mL)	H ₂ O desionizada (mL)	Solución C ⁺⁺ (mL)*	Solución D ⁺⁺ (mL)**
Blanco	-----	0.25	1	0.1
Problema	0.01	0.24	1	0.1
* Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente				
** Mezclar e incubar 45 minutos a temperatura ambiente				
Leer Abs a 550 nm				
(Thermo Scientific, GENESYS 10 UV)				

++ Consultar la preparación de la solución en el anexo III

5.6.5.3. CÁLCULOS (ver fórmula para obtener mg de proteína en el anexo II)

$$\frac{mg \text{ de proteína}}{mL \text{ de lisado}} = mg \text{ de proteína} \times 100$$

5.6.6. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ARGINASA

5.6.6.1. FUNDAMENTO

Es una reacción de condensación entre α -isonitrosopropiofenona (ISPF) y urea (liberada por acción de la enzima arginasa) en un medio ácido, dando lugar a la formación de diazina, compuesto que se puede cuantificar a 544 nm. Se le hicieron algunas modificaciones al método original para adaptarlo al tipo celular que se manejó. (Corraliza IM et al., 1994)

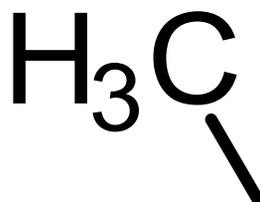


Figura 8. Fundamento de la cuantificación de urea.

5.6.6.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ARGINASA EN PLAQUETAS

	Blanco	Problema
Solución lítica para plaquetas⁺⁺	0.025 mL	-----
Lisado de plaquetas	-----	0.025 mL
MnCl₂ 10mM⁺⁺	0.025 mL	0.025 mL
Mezclar e incubar 10 minutos a 55 °C (“activación”)		
L-Arginina 0.5 M pH 9.7⁺⁺	0.05 mL	0.05 mL
Mezclar e incubar 60 minutos a 37 °C		
Mezcla ácida⁺⁺	0.4 mL	0.4 mL
ISPF 4.5 %⁺⁺	0.025 mL	0.025 mL
Mezclar e incubar 45 minutos en baño de agua en ebullición		
Enfriar y centrifugar a 10000 rpm durante 2 minutos		
Leer Abs del sobrenadante a 544 nm (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV)		

⁺⁺ Consultar la preparación de la solución en el anexo III

5.6.6.3. CÁLCULOS (ver fórmula para obtener nmoles de urea en el anexo II)

- Actividad específica por mg de proteína

$$\frac{\text{nmoles de urea}}{\text{mg de proteína/min}} = \left(\frac{\text{nmoles de urea} \times 40}{60} \right) \div \left(\frac{\text{mg de proteína}}{\text{mL de lisado}} \right)$$

- Actividad por número de plaquetas

$$\frac{\text{nmoles de urea}}{10^8 \text{ plaquetas/min}} = \left(\frac{\text{nmoles de urea} \times 40}{60} \right) \div \left(\frac{10^8 \text{ plaquetas}}{\text{mL de lisado}} \right)$$

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante diferentes pruebas estadísticas, prueba de t student para muestras independientes, ANOVA de una vía, comparaciones múltiples mediante una prueba post-hoc de Bonferroni y regresión lineal. Con el programa prisma 5 (Graph Pad), se considera una significancia del 95 %.

6. RESULTADOS

6.1. CURVA ESTÁNDAR DE NÚMERO DE PLAQUETAS

La turbidez del PRP no está dada únicamente por las plaquetas. Es por esto que también se tomaron las lecturas del PPP. De este modo, la absorbencia o turbidez del plasma dada por las plaquetas es:

$$\text{Abs (600nm) PRP} - \text{Abs (600nm) PPP} = \text{Abs real}$$

Sólo se reportan los valores de la curva que presentaron un comportamiento lineal, como se puede observar en la figura 9.

N° de plaquetas/ μ l de plasma	Abs (600 nm)	N° de plaquetas/ μ l de plasma	Abs (600 nm)
91000	0.421	186368	0.638
92000	0.413	188416	0.630
100000	0.432	194970	0.725
104000	0.445	204800	0.677
105000	0.430	209715	0.663
106000	0.423	212992	0.707
119000	0.503	215040	0.688
128000	0.502	216269	0.649
132000	0.500	217088	0.677
134000	0.497	219546	0.706
141000	0.478	231014	0.665
149094	0.577	232960	0.688
150733	0.570	235520	0.683
163840	0.617	243712	0.782
170394	0.651	256000	0.733
172032	0.611	262144	0.734
173670	0.611	266240	0.752

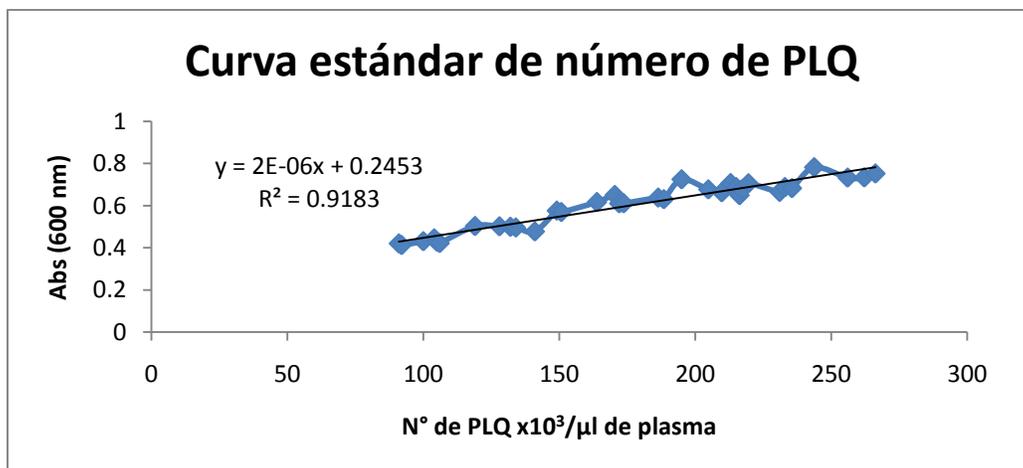


Figura 9. Relación del número (N°) de plaquetas (PLQ) con la turbidez (600nm) del plasma.

Basándonos en la ecuación de la regresión lineal, concluimos que:

$$N^{\circ} \text{ de plaquetas/mL de plasma} = \frac{((Abs \text{ PRP} - Abs \text{ PPP}) - 0.2453362) \times 10^9}{2}$$

6.2. DATOS DEMOGRÁFICOS DE LOS PACIENTES CON EPOC

En la tabla 3 se observa el número de pacientes (N) del grupo control y de los pacientes con EPOC en sus diferentes estadios (GOLD I, II, III, IV), así como la edad y el índice de masa corporal (IMC, kg/m²) de cada grupo, reportado con la media y la desviación estándar ($\bar{x} \pm DE$) de los datos. En el caso de la edad y el IMC no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3. Datos demográficos de los diferentes estadios de la EPOC.

Parámetros	CONTROL	GOLD I	GOLD II	GOLD III	GOLD IV	Significancia estadística
N	10	6	9	9	4	
Edad	64 ± 9	73 ± 8	66 ± 14	70 ± 7	69 ± 6	ns
IMC	31.3 ± 8	29.4 ± 6.1	28.3 ± 6.3	24.8 ± 4	24.7 ± 4.6	ns

6.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ARGINASA

En la figura 10 se muestra en el eje de las abscisas los grupos que se evaluaron (control, GOLD I, II, III y IV) y en el eje de las ordenadas los nmoles de urea liberada por mg de proteína en un minuto. Los GOLD I (8.49 ± 1.29), II (8.23 ± 1.54), III (7.86 ± 1.64) y IV (8.22 ± 2.51) presentaron diferencias estadísticas significativas al compararlos con el grupo control (3.96 ± 0.59). En cada columna se indica el número de pacientes estudiados (n).

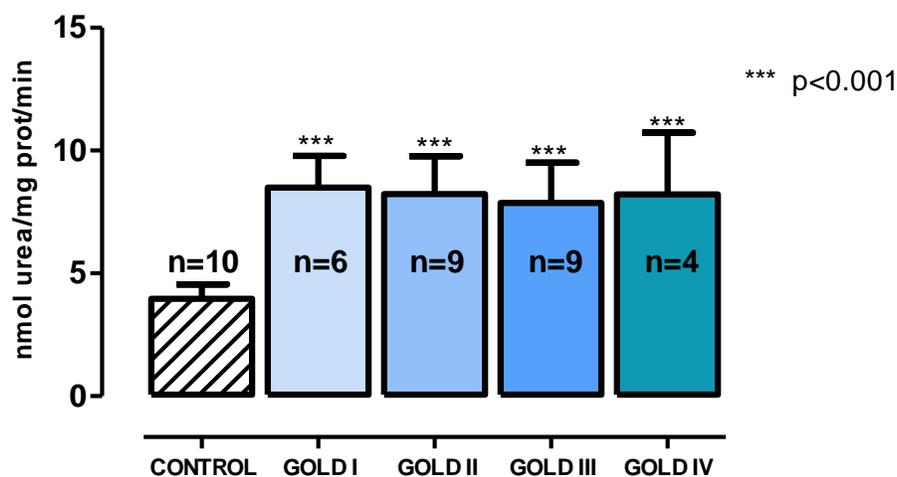


Figura 10. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC (GOLD I, II, III y IV), reportada por mg de proteína.

Al compararse los estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV) entre sí, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es por esto que se agruparon los estadios en una sola columna (EPOC) y se comparó con el grupo control. En la figura 11 se muestra en el eje de las abscisas los grupos que se evaluaron (control y EPOC) y en el eje de las ordenadas los nmoles de urea liberada por mg de proteína en un minuto. La columna de los pacientes ex fumadores con EPOC (8.21 ± 1.53) presentó diferencias estadísticas significativas al compararla con el grupo control (3.96 ± 0.59). En cada columna se indica el número de pacientes estudiados (n).

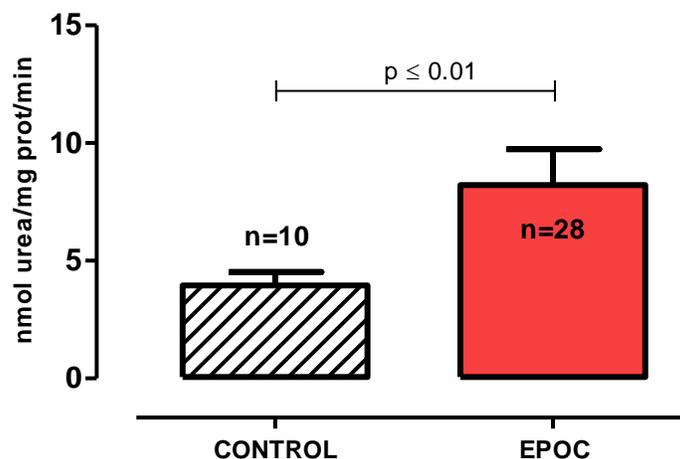


Figura 11. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC, reportada por mg de proteína.

En la figura 12 se muestra en el eje de las abscisas los grupos que se evaluaron (control, GOLD I, II, III y IV) y en el eje de las ordenadas los nmoles de urea liberada por número de plaquetas (PLQ) en un minuto. Los GOLD I (5.56 ± 1.32),

II (5.57 ± 2) y III (5.28 ± 2.1) presentaron diferencias estadísticas significativas al compararlos con el grupo control (2.25 ± 0.5). El GOLD IV (5.18 ± 0.7). En cada columna se indica el número de pacientes estudiados (n).

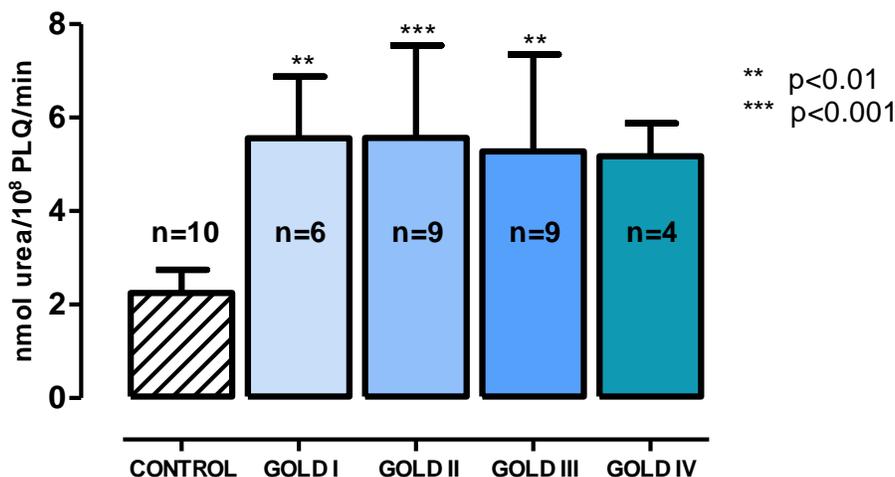


Figura 12. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC (GOLD I, II, III y IV), reportado por número de plaquetas (PLQ).

Al compararse los estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV) entre sí, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es por esto que se agruparon los estadios en una sola columna (EPOC) y se comparó con el grupo control. En la figura 13 se muestra en el eje de las abscisas los grupos que se evaluaron (control y EPOC) y en el eje de las ordenadas los nmoles de urea liberada por número de plaquetas (PLQ) en un minuto. La columna de los pacientes ex fumadores con EPOC (5.35 ± 1.7) presentó diferencias estadísticas significativas al compararla con el grupo control (2.25 ± 0.5). En cada columna se indica el número de pacientes estudiados (n).

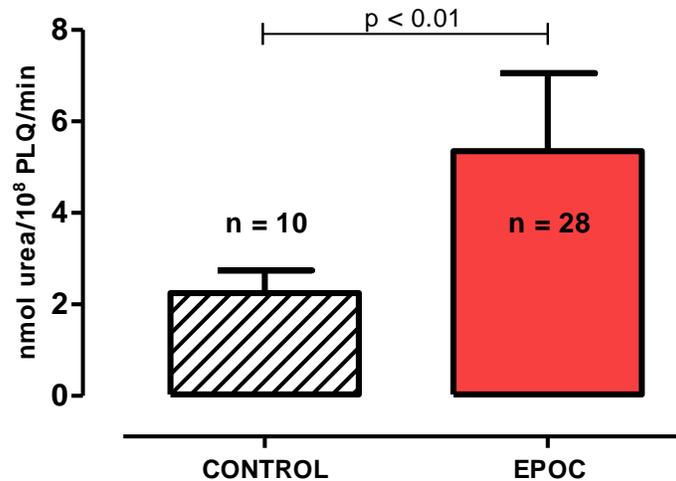


Figura 13. Actividad enzimática de arginasa en pacientes ex fumadores con EPOC, reportada por número de plaquetas (PLQ).

La actividad enzimática se reportó tanto por número de plaqueta como por mg de proteína. En la literatura sólo se reporta por número de plaqueta ó por mg de proteína. La actividad por mg de proteína puede verse alterada, en el caso de las plaquetas, por pequeñas contaminaciones de plasma sanguíneo (que contiene 70-85 mg proteína/ml de plasma). Es por eso que se decidió lavar las plaquetas con una solución ligeramente ácida (pH 7.2) con EDTA (agente secuestrador de Ca^{2+}), evitando la agregación plaquetaria mientras se retiran los residuos de plasma. Para corroborar éstos resultados, se reportó la actividad también por número de células. En los gráficos (figuras 9-12) se muestra que en ambos casos el comportamiento de la actividad en cada grupo es el mismo. Por lo que en futuras mediciones es válido reportar de una de las dos maneras.

7. DISCUSIÓN

El pulmón es la mayor fuente de NO, sintetizado por la eNOS en el endotelio de la vasta circulación pulmonar, por la iNOS en la gran superficie del epitelio y por la nNOS en los nervios noadrenérgicos no Colinérgicos. El NO producido en el pulmón tiene un papel importante en la fisiología del mismo, incluyendo la relajación del músculo liso vascular y de la vía aérea, la defensa contra el huésped y la bacteriostasis, el aclaramiento mucociliar y la secreción de moco en las vías aéreas.^(Dweik, 2007)

El NO también se relaciona con diferentes enfermedades pulmonares, como la EPOC, caracterizada por una progresiva e irreversible disminución de la función pulmonar. La EPOC en la actualidad es un problema de salud pública y dada su creciente progresión se considera la quinta causa de discapacidad y la tercera de mortalidad en el mundo para el año 2020.^(Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2005) Uno de los factores de riesgo de esta enfermedad es el humo de cigarro. El fumador, inicia una inflamación pulmonar caracterizada por la prominente infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T.

El paciente con EPOC presenta una hipersensibilidad de las vías aéreas y la progresiva disminución de la función pulmonar está asociada con cambios estructurales en la periferia del pulmón, incluyendo la remodelación de las vías aéreas pequeñas, caracterizada por la hiperplasia de las células secretoras de

moco, la fibrosis de las vías aéreas y el incremento en la masa del músculo liso; así como la destrucción de la pared alveolar. (Maarsingh H, et al., 2008)

Existe evidencia de que en diversas enfermedades pulmonares, incluyendo la EPOC, las células sanguíneas pueden presentar distintas alteraciones. Un ejemplo de estas células son las plaquetas, que tienen la capacidad de liberar mediadores con potentes propiedades inflamatorias o anafilácticas. (De Castro J, et al., 2007) Las plaquetas son unas de las primeras células que se acumulan en los sitios de daño tisular, para liberar factores que inician una cascada inflamatoria que atrae a leucocitos, activa células blanco y estimula el crecimiento y reparación del vaso dañado.

La EPOC se puede ver agravada por eventos trombóticos en la circulación pulmonar, por anomalías en la coagulación sanguínea y por la fibrinólisis. En los pacientes con este padecimiento se reporta un incremento en los niveles de β -tromboglobulina (β -TG) en plasma, un incremento en la agregación plaquetaria y el incremento de la sensibilidad plaquetaria a agonistas exógenos, que se correlaciona con elevados niveles de interleucina-1 β (IL-1 β) y de interleucina-6 (IL-6), sugiriendo una relación entre la respuesta inflamatoria y el estado protrombótico observado en esta condición patológica. (Ferroni P, et al., 2000) Entonces, las plaquetas se vinculan con enfermedades como la EPOC, debido a su participación en el proceso inflamatorio, la remodelación tisular y los mecanismos de defensa innata, características que en buena parte se relacionan con la importante contribución de NO al flujo sanguíneo.

El NO desempeña un papel dual en la biología humana. Por un lado, cumple funciones centrales en varios órganos y sistemas, en lo que podríamos llamar el nivel homeostático de NO, importante para el funcionamiento normal de los tejidos. (Rojo DM, et al., 2003) Por otra parte los niveles supra e infra-fisiológicos, se encuentran vinculados al desarrollo de patología. La reducción de los niveles de NO pueden ser el resultado del incremento del estrés oxidativo inducido por fumar, a través de la formación de peroxinitrito a partir de NO y anión superóxido, pero también puede ser debido al desacoplamiento de las NOS inducido por un incremento en la actividad de la enzima arginasa, al disminuir la disponibilidad de L-arginina para la formación de NO por las NOS. Como se muestra en las figuras 9-12, los resultados muestran que una vez que la actividad de la enzima se incrementa, ésta no sigue incrementándose conforme avanza la enfermedad, sino que se mantiene al mismo nivel en los 4 estadios de la EPOC. Probablemente para ver una progresión en el aumento de la actividad de la enzima, se tengan que hacer estudios con pacientes fumadores con diferente índice tabáquico, de tal forma que se pueda observar en qué momento comienza a alterarse la actividad enzimática. Resulta interesante que la actividad de esta enzima se vea alterada a tal grado y que no regrese a sus niveles basales de actividad en ninguna etapa de esta patología, sobre todo cuando los pacientes tienen al menos 5 años sin fumar. Es posible que exista una disminución en la producción de NO por el incremento de la enzima arginasa, y que las plaquetas de los pacientes con EPOC podrían estar mucho más activas que las de un individuo sano. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios de hiperactividad plaquetaria en pacientes con EPOC. (Basili S, et al., 1996)

La arginasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de L-arginina en L-ornitina y urea. Existen dos isoformas, arginasa I y arginasa II, citoplasmática y mitocondrial respectivamente. Las arginasas extra-hepáticas tienen un papel fisiológico fundamental en la regulación de la síntesis de NO (capaz de reaccionar con metaloproteínas que contiene grupos hemo, con el O₂ y con EROs) y de los procesos de proliferación y remodelación celulares. Como ya se ha mencionado, el incremento de la actividad de estas enzimas induce a un desacoplamiento de las NOS, lo cual conduce a un estado de estrés oxidativo.

Estudios preliminares de western blot en nuestro laboratorio, sugieren que la isoenzima que se encuentra en la plaqueta es la arginasa II. Estudios previos ya han relacionado el incremento de la expresión génica de esta isoenzima en las plaquetas de pacientes con la enfermedad de células falciformes, (Raghavachari N, et al., 2007) pero no se había cuantificado la actividad de la misma. La NOS mitocondrial (mtNOS) es una modificación postraduccional de la nNOS (López-Figueroa MO et al., 2000) y se encuentra asociada a la membrana mitocondrial interna (MMI). Mientras que la arginasa II está asociada a la membrana mitocondrial externa (MME). (Nissim I et al., 2005). El hecho de que la plaqueta posea a la arginasa II, sugiere que la mitocondria de esta célula participa de manera importante en la regulación del metabolismo del NO en la plaqueta.

La cadena respiratoria mitocondrial transporta los electrones provenientes del metabolismo oxidativo hacia un aceptor final (O₂) y acopla este proceso al bombeo de protones hacia el espacio intermembranal. Este último proceso es responsable de la generación del potencial electroquímico transmembranal ($\Delta\psi$)

necesario para la síntesis de ATP y la homeostasis iónica en la mitocondria. El blanco más sensible para el NO en la cadena respiratoria es la citocromo c oxidasa (COX o complejo IV), donde éste radical se une al sitio de unión binuclear (hemo/Cu) del O₂ de dicho complejo. La exposición a NO por periodos cortos de tiempo, y a concentraciones fisiológicas (50-100 nM), inhibe rápidamente al complejo IV mitocondrial de una manera reversible y competitiva con el O₂ en el complejo IV aislado. (Brown GC, Cooper CE, 1994) Se ha propuesto que el probable significado fisiológico de esta interacción podría ser: a) la regulación de la producción de H₂O₂, (Brookes P, Darley-Usmar VM, 2002) b) la regulación de la liberación del citocromo c durante la apoptosis (Brookes P and Darley-Usmar VM, 2002) y c) la prevención de hipoxia en tejidos vivos mediante la inhibición de la respiración mitocondrial, con lo cual se extenderían los gradientes de difusión del O₂ provenientes de los vasos sanguíneos, permitiendo que el O₂ difunda hasta células más distales. (Thomas DD, et al., 2001; Brookes PS, et al., 2003) Como la actividad de arginasa II es un regulador de la actividad de las NOS, en este caso de mitNOS, entonces también regula de manera indirecta los procesos involucrados con la interacción del NO y el citocromo c, ya que regula los niveles de NO.

En la tabla 5 se muestran los datos demográficos de los pacientes y destaca que en el estadio IV de EPOC solo tenemos 4 pacientes, esto se debe a que nuestros pacientes son ambulatorios y que en este estadio prácticamente todos los pacientes se encuentran hospitalizados y severamente afectados por la enfermedad. No se decidió excluir a este grupo porque los datos obtenidos no son dispersos ni interferían con el reporte de los resultados.

Faltaría determinar si el aumento de la actividad de la enzima arginasa se debe a una sobreexpresión de la enzima o simplemente a la activación de la proteína ya existente.

Por todo lo anterior, es importante no sólo incrementar las medidas de prevención, y diagnóstico temprano de esta enfermedad, sino también el desarrollo de nuevos tratamientos que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen EPOC. Por los resultados del presente trabajo, se propone la realización de otros que den continuidad al presente, específicamente en el sentido de establecer el posible uso de inhibidores específicos de la arginasa II. El uso de estos inhibidores específicos podría ayudar a disminuir el estrés oxidativo en estos pacientes, así como la hiperactividad plaquetaria y por lo tanto los eventos trombóticos que se presentan en esta patología, que a su vez son causantes del agravamiento de la misma. Probablemente esto podría comenzar a tratarse desde que el paciente es fumador. Lo cual ayudaría a disminuir el riesgo de desarrollar la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

El aumento de la actividad de la enzima arginasa en plaqueta, es una alteración presente en los pacientes con EPOC.

El aumento de la actividad de la enzima arginasa en plaqueta no es proporcional al grado de severidad de la EPOC (GOLD I, II, III, IV).

La inhibición de la arginasa podría disminuir las alteraciones plaquetarias relacionadas con el metabolismo del NO y con el estrés oxidativo en esta enfermedad.

9. PERSPECTIVAS

Algunos estudios han mostrado la existencia de una hiperreactividad plaquetaria en la EPOC. Nuestros estudios sugieren que esta condición podría deberse, al menos en parte, a una alteración en el metabolismo del NO en la plaqueta por el aumento en la actividad de arginasa. Para establecer si esto es cierto, se propone la realización de un estudio de agregación plaquetaria en plaquetas de pacientes con EPOC y el efecto de inhibidores de arginasa en esta función plaquetaria.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews R, May JA, Vickers J, Heptinstall S. *Inhibition of platelet aggregation by transdermal glyceryl trinitrate*. Br Heart J 1994; 72: 575-579.
2. Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. *Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 10089-10093.
3. Basili S, Ferroni P, Pulcinelli FM, Pettirossi G, Vieri M, Violi F, Alessandri C, Cordova C, Gazzaniga PP. *Potential usefulness of antiplatelet agents in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Thromb Res 1996; 4: 279-284.
4. Belik J, Shehnaz D, Pan J, Grasemann H. *Developmental changes in arginase expression and activity in the lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Phys 2008.
5. Bergeron C, Boulet LP, Page N, Laviolette M, Zimmermann N, Rothenberg ME, Hamid Q. *Influence of cigarette smoke on the arginine pathway in asthmatic airways: Increased expresión of arginase I*. J Allergy Clin Immunol 2007; 119: 391-397.
6. Berkels R, Stockklauser K, Rosen P, Rosen R. *Current status of platelet NO synthases*. Thromb Res 1997; 87: 51-55.
7. Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Frolich JC. *Differential inhibition of human platelet aggregation and thromboxane A₂ formation by L-arginine in vitro*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998; 357: 143-150.

8. Bodzenta-Lukaszyk A, Gabryelewicz A, Lukaszyk A, Bielawiec M, Konturek JW, Domschke W. *Nitric oxide synthase inhibition and platelet function*. *Thromb Res* 1994; 75: 667-672.
9. Bredt DS, Zinder SH. *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 175.
10. Broekman MJ, Eiroa AM, Macus AJ. *Inhibition of human platelet reactivity by endothelial cells in suspension: Blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism*. *Blood* 1991; 78: 1033-1040.
11. Brookes P, Darley-VM. *Hypothesis: the mitochondrial NO signaling pathway and the transduction of nitosative to oxidative cell signals: an elternative function for cytochrome C oxidase*. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 370-374.
12. Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, Doeller JE, Barone M, Patel RP, Lancaster JR, Darley-USmar V. *Control of mitochondrial respiration by NO , effects of low oxygen and respiratory state*. *J Biol Chem* 2003; 278: 31603-31609
13. Brown GC, Cooper CE. *Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase*. *FEBS Lett* 1994; 356: 295-298.
14. Brune B, Lapetina EG. *Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents*. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455-8458.
15. Busse R, Fleming I. *Pulsatile stretch and shear stress: Physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors*. *J Vasc Res* 1998; 35: 73-84.

16. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. *Determination of arginase activity in macrophages: a micro-method.* J Immunol Methods 1994; 174: 231-235.
17. De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, Sardina JL, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J. *Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma.* Platelets 2007; 18 (1): 43-51.
18. Dekhuizen PN, Aben KK, Dekker I, Aarts LP, Wielders PL, van Herwaarden CL, Bast A. *Increased exhalation of hydrogen peroxide in patient with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 813-816.
19. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34: 906-911.
20. Dweik RA. *The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 292: L15-L17.
21. Ferroni P, Basili S, Martini F, Vieri M, Labbadia G, Cordova C, Alessandri C, Gazzaniga PP, Basil S. *Soluble P-selectin as a marker of platelet hyperactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease.* J Investing Med 2000; 48: 21-27.
22. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. *Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment.* J Clin Invest 1997; 100: 350-356.

23. Gao X, Xu X, Belmadani S, Park Y, Tang Z, Feldman AM, Chilian WM, Zhang C. *TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury*. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2007; 27: 1269-1275.
24. Gear AR, Camerini D. *Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense*. *Microcirculation* 2003; 10: 335-350.
25. *Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. (GOLD)*. Junio 27, 2005.
26. Gordge MP, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA. *Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the antiplatelet action of S-nitroso-glutathione*. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 141-148.
27. Griffith OW, Stuehr DJ. *Nitric oxides synthases: properties and catalytic mechanism*. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 707.
28. Guyton-Hall. *Unidad 6: Células sanguíneas, inmunidad y coagulación de la sangre. Capítulo 33: Resistencia del organismo a la infección: Leucocitos, granulocitos, sistema monocito-macrófago e inflamación*. En *Tratado de Fisiología Médica, décima edición*. Ed. McGraw-Hill 2001; 477-487.
29. Guzmán AM, 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: 240-246.
30. Haffner C, Jarchau T, Reinhard M, Hoppe J, Lohmann SM, Walter U. *Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-*

- rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP*. EMBO J 1995; 14: 19-27.
31. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6:150-166.
 32. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. *Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study from data of the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Epidemiol 2002; 156:738-746.
 33. Horstrup K, Jablonka B, Hönig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U. *Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser 157 in intact human platelet correlates with fibrinogen receptor inhibition*. Eur J Biochem 1994; 225: 21-27.
 34. Houston DS, Buchanan MR. *Influence of endothelium-derived relaxing factor on platelet function and hemostasis in vivo*. Thromb Res 1994; 74: 25-37.
 35. Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi>
 36. Imamura M, Waseda Y, Marinova GV, Ishibashi T, Obayashi S, Sasaki A, Nagai A, Azuma H. *Alterations of NOS, arginase, and DDAH protein expression in rabbit cavernous tissue after administration of cigarette smoke extract*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 293: R2081-R2089.
 37. Irwin C, Roberts W, Naseem KM. *Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation*. Platelets 2009; 15: 1-9.

38. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. *Comparative properties of arginases*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1996; 114: 107-32.
39. Jiang M, Ding Y, Su Y, Hu X, Li J. *Zhang Z Arginase-flotillin interaction brings arginase to red cell membrane*. FEBS Lett 2006; 580: 6561-6564.
40. Johansson JS, Haynes DH. *Cyclic GMP increases the rate of the calcium extrusion pump in intact platelets but has no direct effect on the dense tubular calcium accumulation system*. Biochem Biophys Acta 1992; 1105: 40-50.
41. Jurasz P, Radomski A, Sawicki G, Mayers I, Radomski MK. *Nitric oxide and platelet function*. In Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. Ed. Academic Press Vol 2. 2000; 823-840.
42. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. *Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care 2008; 31: 134-139.
43. Katusic ZS. *Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I*. Circ Res 2007; 101: 640-641.
44. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. *Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatics patients*. Lancet 1994; 343: 133-135.
45. Kielstein JT, Cooke JP. *Arginine metabolism, pulmonary hypertension, and sickle cell disease*. JAMA 2005; 294: 2433-2434.
46. Launay JM, Bondoux D, Oset-Gasque MJ, Emami S, Mutel V, Haimart M, Gespach C. *Increase of human platelet serotonin uptake by atypical histamine receptors*. Am J Physiol 1994; 266: R526-R536.

47. Liu A, Nakatsu K, Brien JF, Beaton ED, Marks GS, Maurice DH. *Selective sequestration of nitric oxide by subcellular components of vascular smooth muscle and platelets: Relationship to nitric oxide stimulation of the soluble guanylyl cyclase*. Can J Physiol Pharmacol 1993; 71: 938-945.
48. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S. *Chronic obstructive pulmonary disease: chronic burden and future projections*. Eur Respir J 2006; 27: 397-412.
49. López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Ronn LC, Akil H, Watson SJ. *Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun 2000; 272: 129-133.
50. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
51. Maarsingh H, Leusink J, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H. *Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma*. Respir Res 2006; 7: 6.
52. Maarsingh H, Pera T, Meurs H. *Arginase and pulmonary disease*. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol 2008a; 378: 171-184.
53. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. *Arginine homeostasis in allergic asthma*. Eur J Pharmacol 2008b; 585: 375-384.
54. Martínez-Cuesta MA, Radomski MW. *Cyclic GMP mediates the inhibitory effect of nitric oxide on platelet adhesion*. In The Biology on Nitric Oxide Part 6. Portland Press, London and Miami 1998; 141.

55. Masuda H. *Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction.* Int J Urol 2008, 15: 128-134.
56. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlestein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. *Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related nitrovasodilators.* Blood 1981; 57: 946-955.
57. Menezes AM, Pérez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG; PLATINO Team. *Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study.* Lancet 2005; 366: 1875-1881.
58. Menshikov MY, Ivanova K, Schaefer M, Drummer C, Gerzer R. *Influence of the cGMP analogue 8-PCPT-cGMP on agonist-induced increases in ionized calcium and on aggregation of human platelets.* Eur J Pharmacol 1993; 245: 281-284.
59. Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Breckwolt WL, Rohrer MJ, Barnard MR, Loscalzo J. *Effects of nitric oxide/EDFR on platelet surface glycoproteins.* Am J Physiol 1996; 39: H1640-H1648.
60. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans CD, Fuentes JM, Kropf P, Mueller I, Kolb A, Modolell M, Ho AD. *Suppression of T-Cell by human granulocyte arginase.* Blood 2006; 108: 1627-1634.
61. Nakashima S, Tohmatsu T, Hattori H, Okano Y, Nozawa Y. *Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization*

- in thrombin-stimulated human platelets*. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 1099-1104.
62. Nakatsuka M, Osawa Y. *Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 1630-1634.
63. Nelin LD, Chicoine LG, Reber KM, English BK, Young TL, Liu Y. *Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 394-401.
64. Nissim I, Luhovyy B, Horyn O, Daikhin Y, Nissim I, Yidkoff M. *The role of mitochondrially bound arginase in the regulation of urea synthesis: studies with [U-15N4]arginine, isolated mitochondria, and perfused rat liver*. *J Biol Chem* 2005; 280: 17715-17724.
65. Pauwels RA, Buist S, Calverly PMA, Jenkins C, Hurd S. *Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLB/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.
66. Pawel RA, Rabe KF. *Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease*. *Lancet* 2004; 364: 613-620.
67. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. *Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension*. *Lancet* 1991; 338: 1173-1174.
68. Pohl U, Busse R. *EDFR increases cyclic GMP in platelets during passage through the coronary vascular bed*. *Circ Res* 1989; 65: 1798-1803.

69. Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J, Solomon MA, Suffredini AF, Danner RL, Kato G, Munson PJ, Morris SM Jr, Gladwin MT. *Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease.* *Circulation* 2007; 115: 1551-1562.
70. Radomski MW, Moncada S. *Role of nitric oxide in endothelial cell-platelet interactions.* In *Antithrombotics.* Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, Boston, and London 1991; 25-48.
71. Radomski MW, Radomski AS. *Regulation of blood cell function by the endothelial cells.* In *Vascular Endothelium in Human Physiology.* Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands 1999.
72. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide.* *Br J Pharmacol* 1987; 92: 639-646.
73. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelet regulates aggregation.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197.
74. Ramírez-Venegas A, Pérez PR, Rivera RM, Sansores HR. *Other causes of chronic obstructive to biofuel smoke.* *Hot Topics in Respiratory Medicine* 2007; 4.
75. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, Reglado J, Velázquez A, Sánchez C, Mayar ME. *Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco.* *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 393-397.

76. Reid KM, Tsung A, Kaizu T, Jeyabalan G, Ikeda A, Shao L, Wu G, Murase N, Geller DA. *Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N^ω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA)*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292: G512-G517.
77. Reinhard M, Halbrügge M, Scheer U, Wergand C, Jockusch BM, Walter U. *The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts*. EMBO J 1992; 11: 2063-2070.
78. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. Physiol Rev 2004; 84: 731-765.
79. Rojo DM, García L, Clapés S, Álvarez MS. *El óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas en la preeclampsia*. Rev Cubana Invest Biomed 2003; 22 (2): 130-140.
80. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Cadwell RW. *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity*. Circ Res 2008; 102: 9-11.
81. Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A, Sikka G, Lim HK, Sohi J, Santhanam L, Soucy K, Tuday E, Baraban E, Ilies M, Gerstenblith G, Nyhan D, Shoukas A, Christianson DW, Alp NJ, Champion HC, Huso D, Berkowitz DE. *Endothelial arginase II. A novel target for the treatment of atherosclerosis*. Circ Res 2008; 102: 923-932.
82. Salas E, Miszta-Lane, Radomski MW. *Regulation of platelet function by nitric oxide and other nitrogen- and oxygen-derived species*. In Handbook of

- Experimental Pharmacology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, and New York 1997; Vol. 126: 371-397.
83. Samb A, Pretolani M, Dinh-Xuan AT, Oukssel H, Callebert J, Lisdero C, Aubier M, Boczkowski J. *Decreased pulmonary and tracheal smooth muscle expression and activity of type 1 nitric oxide synthase (nNOS) after ovalbumin immunization and multiple aerosol challenge in guinea pigs.* Am J Respir Crit Care Med 2001; 164: 149-154.
 84. Santhanam L, Lim HK, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, Balanson S, Ryoo S, Anderson M, Irani K, Khanday F, Di Costanzo L, Nyhan D, Hare JM, Christianson DW, Rivers R, Shoukas A, Berkowitz DE. *Inducible NO synthase-dependent S-nitrosylation and activation of arginase-1 contribute to age-related endothelial dysfunction.* Circ Res 2007; 101: 692-702.
 85. Satriano J. *Arginine pathways and the inflammatory response: inter regulation of nitric oxide and polyamines: review article.* Amino Acids 2004; 26: 321-329.
 86. Silkoff PE, Sylvester JT, Zamel N, Permut S. Air way nitric oxide diffusion in asthma: Role in pulmonary function and bronchial *responsiveness*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1218-1228.
 87. Simon DL, Stamler JS, Loh E, Loscalzo J, Francis SA, Craeger MA. *Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans.* J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 339-342.
 88. Sneddon JM, Vane JR. *Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2800-2804.

89. Stockley RA. *The role of the proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med 1994; S109-S113.
90. Takajo Y, Ikeda H, Haramaki N, Murohara T, Imaizumi T. *Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers. Mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability*. J Am Coll Cardiol 2001; 38: 1320-1327.
91. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, Kuo L. *Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 2035-2042.
92. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR. *The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 355-360.
93. Vallance P, Leiper J. *Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 1023-1030.
94. Venturini CM, Del Vecchio PJ, Kaplan JE. *Thrombin-induced platelet adhesion to endothelium is modified by endothelial derived relaxing factor (EDRF)*. Biochem Biophys Res Commun 1989; 159: 349-354.
95. Walter U. *Physiological role of cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1989; 113: 41-88.
96. Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME. *Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane*

- receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4888-4893.
97. Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, Pou S, Roman LJ, Rosen GM. *A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide. Biochim Biophys Acta* 2005; 1726: 302-308.
98. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. *The evolving role of platelets in inflammation. J Thromb Haemost* 2003; 1:1897-1905.
99. Xie Y, Garban H, Ng C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. *Effect of long-term passive smoking on erectile function and penile nitric oxide synthase in the rat. J Urol* 1997; 157: 1121-1126.
100. Zhang WZ, Venardos K, Chinn-Dusting J, Kaye DM. *Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability. Role of arginine metabolism and oxidative stress. Hypertension* 2006; 48: 278-285.
101. Zhou Q, Hellerman GR, Somononson LP. *Nitric oxide release from resting platelets. Thromb Res* 1995; 77: 1088-1092.
102. Zuyderduyn S, Ninabar DK, Fens N, Maarsingh H, Meurs H, Sterk PJ, Hiemstra PS, Rabe KF. *IL-4 enhances arginase-2 expression in human airway smooth muscle cells (HASM). Proc Am Thoracic* 2006 Soc 3: A462.

ANEXOS

ANEXO I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO GRUPO CONTROL

Tengo ante mí el documento en que se solicita mi autorización que valida el consentimiento informado para participar en un estudio de investigación titulado: Evaluación de la eficiencia del eritrocito para mantener la homeostasis oxidante-antioxidante (redox), en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD I, II y III). Respuesta "in vitro" a contaminantes atmosféricos (PM_{2.5}), el objetivo del estudio es valorar la capacidad de los componentes de la sangre para defenderse de estímulos extraños (contaminación ambiental), así como valorar el daño que pueden causar estos en el organismo, por lo que serán incluidos 60 voluntarios para tal efecto.

Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. Han respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Todas mis dudas han sido aclaradas. En particular, se me ha informado y acepto donar aproximadamente 5 mL de sangre para que estudien la presencia de sustancias que sólo se miden por técnicas de laboratorio especiales las cuales se realizan en la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", en el departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental.

Sé también que la toma de sangre se realizará durante la misma punción venosa para los análisis de laboratorio solicitados, los cuales no tendrán ningún costo.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación informando mi tipo de alimentación, el sitio en donde vivo, así como la actividad laboral que realizo con el fin de permitir, que el investigador tenga una información más completa en apoyo a la investigación.

Al firmar este consentimiento, no he renunciado a mis derechos legales a los que tendría como voluntario en un estudio de investigación, además de que será protegida mi privacidad.

Recibo una copia firmada y fechada de este consentimiento por:

M en C. Yessica Dorin Torres Ramos _____

Dra. Alejandra Ramírez Venegas _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Fecha: _____



ANEXO I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

Tengo ante mí el documento en que se solicita mi autorización que valida el consentimiento informado para participar en un estudio de investigación titulado: Evaluación de la eficiencia del eritrocito para mantener la homeostasis oxidante-antioxidante (redox), en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD I, II y III). Respuesta "in vitro" a contaminantes atmosféricos ($PM_{2.5}$), el objetivo del estudio es valorar la capacidad de los componentes de la sangre para defenderse de estímulos extraños (contaminación ambiental), así como valorar el daño que pueden causar estos en el organismo, por lo que serán incluidos 60 voluntarios para tal efecto.

Me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio. Han respondido a mi satisfacción todas mis preguntas respecto a este estudio. Todas mis dudas han sido aclaradas. En particular, se me ha informado y acepto donar aproximadamente 5 mL de sangre para que estudien la presencia de sustancias que sólo se miden por técnicas de laboratorio especiales las cuales se realizan en la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", en el departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental. Estoy enterado de que la determinación de esas sustancias sirve para que el médico tenga una información más completa sobre mi padecimiento y pueda tener un mejor seguimiento de la evolución de mi enfermedad.

La evaluación de la función de las células de la sangre de la misma muestra tiene un objetivo similar. Sé también que la toma de sangre se realizará durante la misma punción venosa que se utilizará para la evaluación de los análisis de laboratorio solicitadas por el médico tratante como apoyo al diagnóstico y evolución de mi padecimiento.

Doy mi consentimiento de participación en esta investigación informando mi tipo de alimentación, el sitio en donde vivo, así como la actividad laboral que realizo con el fin de permitir, que el médico tenga una información más completa en apoyo a mi tratamiento y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en cualquier momento que yo lo decida. Sé que esta decisión no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.

Al firmar este consentimiento, no he renunciado a mis derechos legales a los que tendría como paciente en un estudio de investigación, además de que será protegida mi privacidad.

Recibo una copia firmada y fechada de este consentimiento por:

M en C. Yessica Dorin Torres Ramos

Dra. Alejandra Ramírez Venegas

Nombre del paciente:

Firma del paciente:

Nombre del testigo:

Firma del testigo:

Nombre del testigo:

Firma del testigo:

Fecha: _____



ANEXO I



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

INFORME AL TITULAR DE SUS DATOS PERSONALES

Los datos personales serán protegidos, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado BASES DE DATOS DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, con fundamento en Ley General de Salud en Materia de Investigación, Decreto INER 04-08-88, Ley General D.O.F. 7-II-1984 Ref. D.O.F. 27-V-1987, 23-XII-1987, 14-IV-1991, 7-V-1997, F.E. D.O.F. 6-IX-1984, 23-VII-1986, 18-11-1988, 12-VII-1991; Adiciones D.O.F. 21-X-1988, 24-X-1994, 26-VII-1995, 9-VII-1996; Ley de los Institutos Nacionales de Salud D.O.F. 26-V-2000, cuya finalidad es concentrar la información necesaria para el desarrollo del proyecto de investigación para lo cual fue reclutado el paciente, fue registrado en el sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública, IFAI (www.ifai.org.mx). La unidad administrativa responsable del sistema de datos personales es el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dirección de Investigación, Dirección Médica e Investigadores, la dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso y corrección ante la misma es la Unidad de Enlace del INER, ubicada en Calzada de Tlalpan 4502. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan.

Lo anterior se informa en cumplimiento del Decimoséptimo de los Lineamientos de Protección de Datos Personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación del 30 de septiembre de 2005.

ENTREGA PERSONAL ADMINISTRATIVO INER, NOMBRE: _____

RECIBE PACIENTE O FAMILIAR DEL PACIENTE, NOMBRE: _____

FIRMA: _____ FECHA: ____ / ____ / ____



INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

INFORME AL TITULAR DE SUS DATOS PERSONALES

Los datos personales serán protegidos, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado BASES DE DATOS DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, con fundamento en Ley General de Salud en Materia de Investigación, Decreto INER 04-08-88, Ley General D.O.F. 7-II-1984 Ref. D.O.F. 27-V-1987, 23-XII-1987, 14-IV-1991, 7-V-1997, F.E. D.O.F. 6-IX-1984, 23-VII-1986, 18-11-1988, 12-VII-1991; Adiciones D.O.F. 21-X-1988, 24-X-1994, 26-VII-1995, 9-VII-1996; Ley de los Institutos Nacionales de Salud D.O.F. 26-V-2000, cuya finalidad es concentrar la información necesaria para el desarrollo del proyecto de investigación para lo cual fue reclutado el paciente, fue registrado en el sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública, IFAI (www.ifai.org.mx). La unidad administrativa responsable del sistema de datos personales es el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dirección de Investigación, Dirección Médica e Investigadores, la dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso y corrección ante la misma es la Unidad de Enlace del INER, ubicada en Calzada de Tlalpan 4502. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan.

Lo anterior se informa en cumplimiento del Decimoséptimo de los Lineamientos de Protección de Datos Personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación del 30 de septiembre de 2005.

ENTREGA PERSONAL ADMINISTRATIVO INER, NOMBRE: _____

RECIBE PACIENTE O FAMILIAR DEL PACIENTE, NOMBRE: _____

FIRMA: _____ FECHA: ____ / ____ / ____

ANEXO II

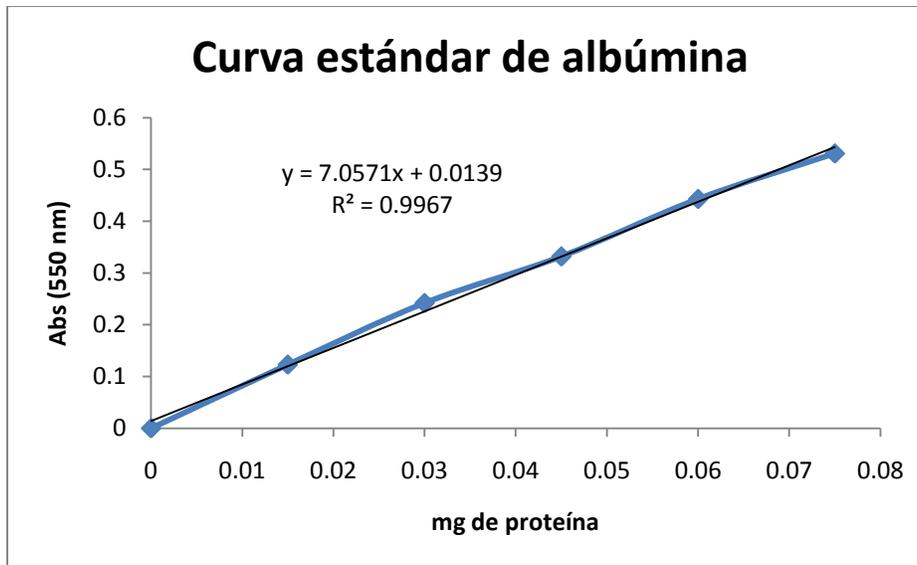
CURVAS ESTÁNDAR

- CURVA ESTÁNDAR PARA PROTEÍNAS UTILIZANDO ALBÚMINA

Tubo	Albúmina sérica bovina [0.3 mg/mL] ⁺⁺ (mL)	Albúmina sérica bovina (mg)	H ₂ O desionizada (mL)	Solución C ⁺⁺ (mL)*	Solución D ⁺⁺ (mL)**
0	-----	-----	0.25	1	0.1
1	0.05	0.015	0.2	1	0.1
2	0.1	0.03	0.15	1	0.1
3	0.15	0.045	0.1	1	0.1
4	0.2	0.06	0.05	1	0.1
5	0.25	0.075	-----	1	0.1
* Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente					
** Mezclar e incubar 45 minutos a temperatura ambiente					
Leer Abs a 550 nm (Thermo Scientific, GENESYS 10 UV)					

++ En el anexo III se describe la preparación de la solución

Tubo	[proteína] mg	Abs (550nm)
0	0	0
1	0.015	0.123
2	0.03	0.242
3	0.045	0.332
4	0.06	0.443
5	0.075	0.531



Basándonos en la ecuación de la regresión lineal, concluimos que:

$$mg \text{ de proteína} = \frac{Abs (550 \text{ nm}) - 0.0139}{7.0571}$$

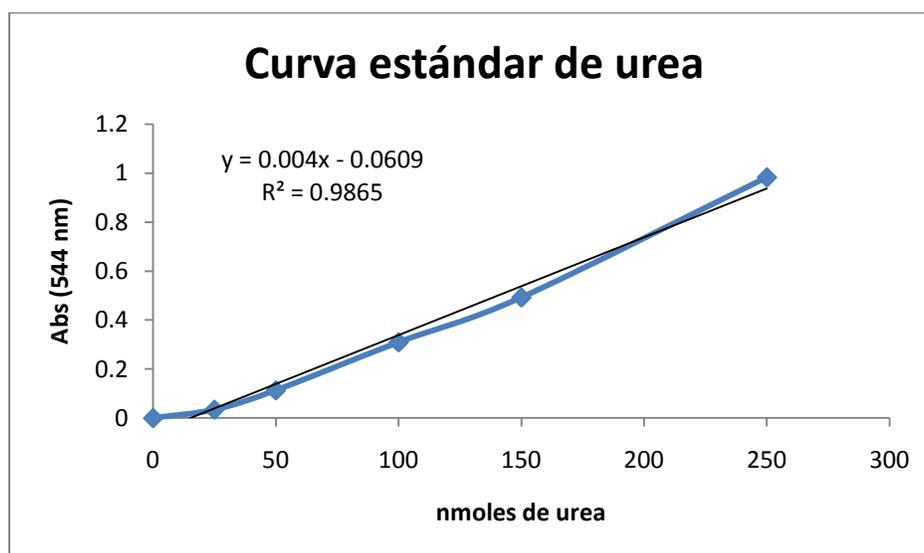
- CURVA ESTÁNDAR DE UREA

Tubo	Urea 5 mM * (mL)	H ₂ O (mL)	Mezcla ácida * (mL)	ISPF al 4.5 % * (mL)	n moles de urea
0	---	0.1	0.4	0.025	0
1	0.005	0.095	0.4	0.025	0.025
2	0.01	0.09	0.4	0.025	0.05
3	0.02	0.08	0.4	0.025	0.1
4	0.03	0.07	0.4	0.025	0.15
5	0.05	0.05	0.4	0.025	0.25

Mezclar e incubar 45 minutos en baño de agua en
Dejar enfriar y leer Abs a 544 nm
(Thermo Scientific, GENESYS 10 UV)

* En el anexo III se describe la preparación de la solución

Tubo	nmoles de urea	Abs (544 nm)
0	0	0
1	25	0.034
2	50	0.113
3	100	0.309
4	150	0.492
5	250	0.982



Basándonos en la ecuación de la regresión lineal, concluimos que:

$$\text{nmoles de urea} = \frac{\text{Abs (544 nm)} - 0.0609}{0.004}$$

ANEXO III

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. **ISPF** (α -isonitrosopropiophenone)

Solución al **4.5%**

- Disolver 0.45 g en 10 mL de DMSO.

2. **L-arginina** PM: 210.86

Solución **0.5 M pH 9.7**

- Disolver 1.05 g en 8 mL de agua desionizada.
- Ajustar pH a 9.7 con NaOH concentrado.
- Aforar a 10 mL con agua desionizada.

3. **MnCl₂** PM: 197.9

Solución **10 mM**

- Disolver 2 mg en 10 mL de TRIS-HCl 50 mM pH 7.5.

NOTA: almacenar en refrigeración y preparar nueva solución cada tercer día.

4. **Mezcla ácida**

H₂SO₄ : H₃PO₄ : H₂O (1:3:7)

- En un matraz Erlenmeyer de 100 mL colocar un agitador magnético.
- Colocar el matraz sobre hielo en un recipiente de plástico.
- Adicionar 56 mL de H₂O desionizada.

- Mientras se mantiene una agitación suave, adicionar lentamente 8 mL de H_2SO_4 (96%).
- De igual manera, adicionar 24 mL de H_3PO_4 (85%).

5. PBS pH 7.4

- Pesar los siguientes reactivos:

Reactivo	Gramos
NaCl	8
KCl	0.2
Na_2HPO_4	1.44
KH_2PO_4	0.24

- Disolver los reactivos en 800 mL de agua desionizada.
- Ajustar con NaOH el pH a 7.4.
- Aforar a 1 L con agua desionizada.

6. PBS-EDTA 1 mM pH 7.2-7.4

- Solución stock **100 mM**: Disolver 0.585 g de EDTA- Na_2 en 10 mL de PBS pH 7.4. Aforar a 20 mL con PBS.
- Solución **1 mM**: Hacer una dilución 1:100 de la solución stock con PBS pH 7.4.

7. Phenylmethanesulfonyl fluoride: PMSF PM: 174.19

Solución **100 mM**

- Disolver 0.174 g de PMSF en 9 mL de DMSO.
- Aforar a 10 mL con DMSO.

- Almacenar en congelación en un envase ámbar.

8. Solución lítica para plaquetas

- Agregar 40 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 a un matraz aforado de 50 mL.
- Añadir 0.005 mL de PMSF 100mM.
- Agregar 0.5 mL de Tritón X 100 al 10%.
- Aforar a 50 mL con Tris HCl 50 mM pH 7.5.

9. Soluciones utilizadas para la determinación de proteínas por el método de Folin-Fenol (Lowry).

- Solución A: Solución de **Na₂CO₃** al **2%** y **tartrato de sodio y potasio** al **0.02%** en **NaOH 0.1 N**.
 - **NaOH** PM: 40 **0.1 N** → Disolver 2 g en 500 mL de agua desionizada.
 - **Na₂CO₃** al **2%** → Disolver 10 g en 400 mL de NaOH 0.1 N.
 - **tartrato de sodio y potasio** al **0.02%** → Disolver 0.1 g en los 400 mL de NaOH 0.1 N - Na₂CO₃.
 - Aforar a 500 mL con NaOH 0.1 N.
 - Solución B: Solución de **CuSO₄** al **0.5%**.
 - Disolver 0.05 g en 10 mL de agua desionizada.
 - Solución C: Solución **cupro-alkalina**.
 - Mezclar **50 ml** de la solución **A** con **1 ml** de la solución **B**
- NOTA: Se prepara al momento de usarse.

- Solución D: Reactivo de **Folin-Ciocalteu**.
 - Diluir en una proporción 1:1 en agua desionizada

NOTA: Preparar solo la cantidad que se vaya a utilizar.

- **Albúmina sérica bovina 0.3mg/mL**.
 - Solución stock: disolver **6 mg** en 1 mL de agua desionizada.

NOTA: Almacenar en congelación.

 - Solución **0.3 mg/mL**: Diluir la solución stock en una proporción 1:20 (0.05 mL de stock – 0.95 mL de agua desionizada).

10. TRIS-HCl

Solución **50 mM pH 7.5**

- Disolver 3.03 g de Tris base (PM: 121.14) en 450 mL de agua desionizada.
- Ajustar pH de 7.5 con HCl.
- Aforar a 500 mL con agua desionizada.

11. Tritón X 100

Solución al **10%**

- Mezclar 10 mL de Tritón X 100 con 90 mL de H₂O desionizada.

12. Urea PM: 60.06

Solución **5 mM**

- Solución stock 50 mM
 - ✓ Disolver 3 mg de urea en 1 mL de agua desionizada.
- Diluir solución de trabajo 5 mM:
 - ✓ Mezclar 1 ml de solución stock 50 mM con 9 mL de agua desionizada. Aforar a 10 ml.