



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A BAJAS DOSIS DE OZONO  
SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE RATA**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**DULCE PAOLA, FLORES BRICEÑO**



**MÉXICO, D.F.**

**2014.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Bernardo Lucas Florentino.

**VOCAL:** Profesor: Perla Carolina Castañeda López.

**SECRETARIO:** Profesor: Selva Lucia Rivas Arancibia.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Francisco Hernández Luis.

**2° SUPLENTE:** Profesor: María Elena Bravo Gómez.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 410, EDIFICIO A.**

**FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia.

## **SUSTENTANTE (S):**

**DULCE PAOLA, FLORES BRICEÑO.**

1. Índice.	
Agradecimientos.	
1. Índice.	1
2. Resumen.	2
3. Introducción.	4
3.1 Estrés Oxidativo.	4
3.1.1 Radicales Libres y formación de especies reactivas.	4
3.1.2 Anión superóxido.	8
3.1.3 Peróxido de hidrógeno.	9
3.1.4 Radical hidroxilo.	11
3.1.5 Radical peroxilo.	12
3.1.6 Oxígeno singulete.	13
3.1.7 Óxido nítrico.	13
3.1.8 Peroxinitrito.	15
3.1.9 Fuentes de radicales libres.	17
3.2 Sistemas antioxidantes.	21
3.2.1 Endógenos.	22
3.2.1.1 Superóxidodismutasa.	22
3.2.1.2 Glutatión peroxidasa.	23
3.2.1.3 Catalasa.	27
3.2.2 Exógenos.	30
3.3 Marcadores de estrés oxidativo.	35
3.4 El tejido sanguíneo.	37
3.4.1 Plasma.	37
3.5 Elementos formes.	38
3.5.1 Eritrócitos.	39
3.5.2 Glóbulos blancos (Leucocitos).	40
3.5.3 Neutrófilos.	43
3.5.4 Eosinófilos.	44
3.5.5 Basófilos.	46
3.5.6 Linfocitos.	48
3.5.7 Monocitos.	50
4. Hipótesis.	52
5. Objetivos.	53
6. Materiales y métodos.	54
6.1 Animales.	54
6.2 Exposición a ozono.	54
6.3 Método de recolección de muestras.	54
6.4 Tinción de Wright.	56
6.5 Western blot.	57
6.6 Espectrometría.	59
6.7 Análisis estadístico	61
7. Resultados.	62
8. Discusión.	67
9. Conclusión.	71
10. Anexo.	72
11. Bibliografía.	74

## 2. Resumen

La exposición repetida por 4 horas diarias a bajas dosis de ozono (0.25 ppm), similares a las que se presentan cuando existe contingencia ambiental causan un estado de estrés oxidativo crónico el cual afecta a todo el organismo. El estrés oxidativo produce alteraciones que aún no han sido ampliamente exploradas en el tejido sanguíneo.

El objetivo del trabajo es estudiar el efecto del estrés oxidativo crónico sobre el número y los cambios morfológicos en células sanguíneas de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono, así como la determinación de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos como la enzima superóxido dismutasa.

### Metodología

Para este fin se utilizaron 30 ratas machos de cepa Wistar entre 250 y 300g de peso, los cuales fueron alojados en cajas individuales con libre acceso a agua y comida, los animales fueron divididos al azar en 5 grupos experimentales de 6 ratas cada uno, cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos: grupo 1) control expuesto a aire, grupo 2) expuesto a 15 días de ozono, grupo 3) expuesto a 30 días de ozono, grupo 4) expuesto a 60 días de ozono, grupo 5) expuesto a 90 días de ozono

Cada uno de los grupos con excepción del grupo control que fue expuesto a aire, se expuso a 4 hrs diarias a 0.25 ppm de ozono. Después de finalizar la última exposición a O<sub>3</sub> del último grupo, se recolectaron aproximadamente 6 mL de sangre de cada animal en tubos heparinizados, se tomaron 4 frotis sanguíneos de cada animal para realizar la tinción de Wright. Se procedió a contar el número de eritrocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos presentes en la sangre en los distintos tratamientos.

Además se centrifugo la sangre y el plasma se utilizó para realizar Western Blot y espectrometría para la cuantificación de la actividad enzimática de la súperoxido dismutasa.

## Resultados

Se pudo observar un incremento en el número linfocitos y de eritrocitos, así como los cambios morfológicos en las células sanguíneas a partir de los 15 días.

## Conclusiones.

Se comprobó que el estado de estrés oxidativo produce un aumento en la población celular de linfocitos, se observó disminución de la actividad de la SOD Cu/Zn en sangre periférica de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono conforme se aumentaba el tiempo de exposición.

### 3. Introducción.

#### 3.1 Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo se define como la pérdida del equilibrio entre la exposición de especies oxidantes y la actividad antioxidante de un sistema, o también como el efecto nocivo que se produce en el organismo cuando hay un aumento de degradación de los hidratos de carbono, grasas y proteínas provocado por radicales libres.

##### 3.1.1 Radicales libres y formación de especies reactivas.

###### Radicales libres

Un radical libre, es una molécula o un elemento que posee un electrón desapareado, lo que le confiere un aumento en la reactividad química y que se representa convencionalmente por un punto oscuro ( $\cdot$ ).

La alta reactividad de dichas especies, es la manifestación de la tendencia del radical a conseguir el estado más estable energéticamente mediante el emparejamiento o apareamiento con otro electrón. Así pues, muchas reacciones radical-radical, tienen

lugar tan pronto como las dos moléculas o átomos reaccionan, además que las moléculas quedaran dañadas por dicha reacción.

En los seres vivos, la concentración de los radicales libres es normalmente muy baja, y raramente adquiere valores lo suficientemente altos como para provocar una reacción radical-radical que sustituya a una reacción entre el radical y una biomolécula, ya que éstas están normalmente presentes en una concentración mucho mayor en su proximidad. Así pues, cualquier reacción radical-radical es menos frecuente, aunque se da, como en el caso de la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido, la cual forma especies reactivas como los peroxinitritos, pero la reacción con una biomolécula está favorecida por la considerablemente mayor concentración de la molécula que va a reaccionar, en comparación con la concentración del radical<sub>1</sub>.

La alta reactividad de los radicales libres hace que su vida media sea muy breve, del orden de milisegundos, variando según el radical libre de que se trate.

En los sistemas biológicos, los radicales libres son habitualmente moléculas de oxígeno o formadas en su mayor parte por el, lo cual hace que a este conjunto de radicales libres se les denomine en

conjunto especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en ingles).

Asimismo, existen también radicales libres nitrogenados o especies de nitrógeno reactivas o radicales libres centrados en otras moléculas, como el azufre.

Tabla 1. Radicales Libres.

	<b>Radical libre</b>	<b>Reacción más común que los origina</b>
<b>•O<sub>2</sub>-</b>	Radical superóxido	$\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADPH}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{•O}_2^-$
<b>•OH</b>	Radical hidroxilo	$\text{•UQ}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{UQ} + \text{•OH} + \text{OH}^-$
<b>RO<sub>2</sub>•</b>	Radical peroxilo	$\text{L•} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{LH} + \text{RO}_2\text{•}$
<b>RO•</b>	Radical alcoxilo o fenoxilo	$\text{R•} + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO•}$
<b>•NO<sub>2</sub></b>	Radical de óxido nítrico	$\text{•OH} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{•NO}_2$

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	
Superóxido	Peróxido de hidrógeno
Hidroxilo	Ácido hipocloroso
Peroxilo	Ácido hipobromoso
Alcoxilo	Ozono
Hidroperoxilo	Singulete de Oxígeno
Especies Reactivas de Nitrógeno (RNS)	
Óxido Nítrico	Ácido nitroso
Dióxido de nitrógeno	Catión nitrosilo
	Anión nitroxilo
	Peroxido de nitrógeno
	Óxido de nitrógeno III
	Peroxinitrito
	Ácido peroxinitroso
	Nitrilo
	Peroxinitritos de alquilo

Especies reactivas.

Son un conjunto de moléculas que son muy reactivas y dañinas para los tejidos, son producidas durante los procesos metabólicos para la eliminación de un radical libre, y resultan tóxicos para la célula.

Por otro lado los radicales libres son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran radicales de oxígeno, nitrógeno, azufre, etc. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas mediante un Proceso de óxido-reducción.

Por ejemplo, las diferentes especies reactivas de oxígeno formadas a partir de la eliminación del anión superóxido pueden participar en distintos tipos de reacciones.

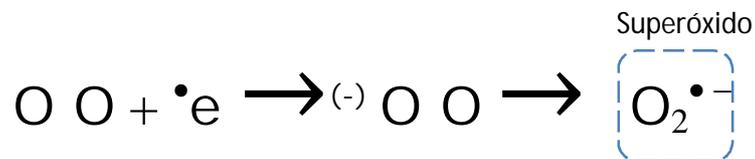
Existen varias clases de radicales libres, entre los más importantes se encuentran:

### 3.1.2 Anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Se trata de un especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que den lugar

a otras ROS que a su vez si son muy reactivas. Este anión puede formarse a través de tres diferentes mecanismos:

- Como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de flavoproteínas de oxidasas e hidroxilasas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.)<sup>2,3,</sup>
- Reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína<sup>4,5</sup> o la riboflavina<sup>6,</sup>
- En la cadena respiratoria mitocondrial<sup>7</sup> (Reacción 1).

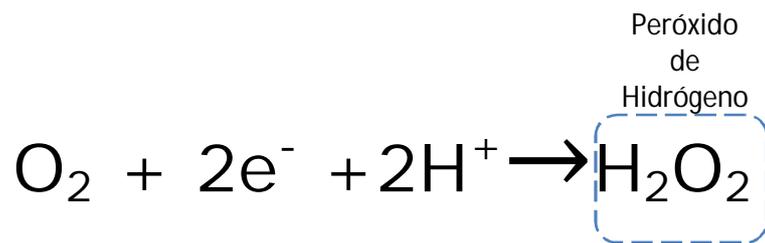


Reacción 1. Formación del anión superóxido.

### 3.1.3 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

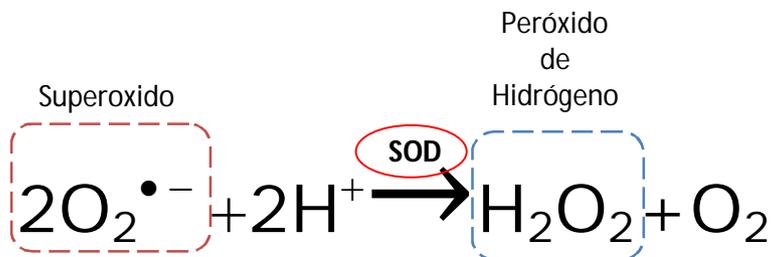
El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, es una especie reactiva de oxígeno, de la cual se debe tener en cuenta su facilidad para difundir a través de las membranas. En los medios biológicos se forma por dos vías:

1. Tras la reducción directa del oxígeno por dos electrones (Reacción 2),



Reacción 2. Reducción del Oxígeno.

2. Por la dismutación del anión superóxido (Reacción 3).



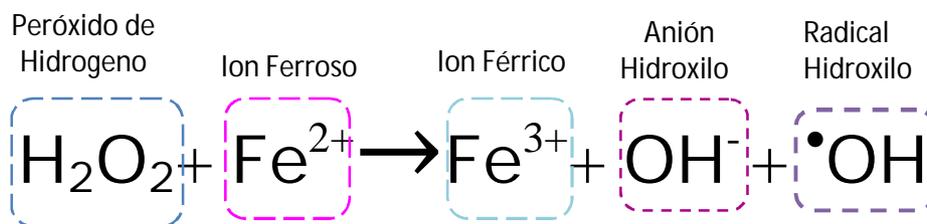
Reacción 3. Dismutación del anión superóxido.

Muchas enzimas producen peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno: xantina oxido reductasa, superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc.<sup>8, 9, 10,11.</sup> y también puede producirse por la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por ion cúprico<sup>12.</sup>

### 3.1.4 Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).

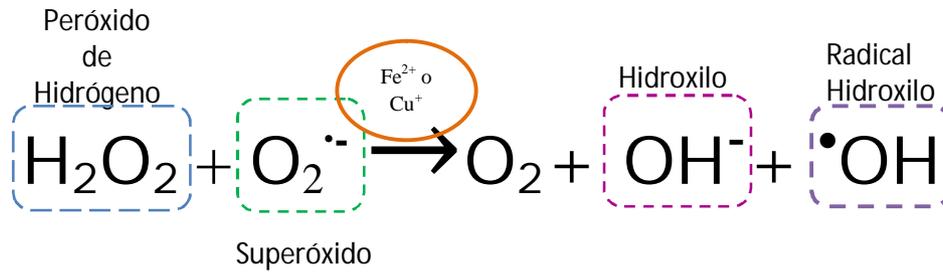
Es la especie más reactiva, con una vida media estimada de alrededor de  $10^{-9}$  segundos<sup>13</sup>. Su alta reactividad hace que su acción química quede reducida a la vecindad del lugar de su formación. Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos gamma) la cual puede provocar ruptura homolítica del agua corporal y como la luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, puede dividir al peróxido de hidrogeno en 2 moléculas de radical hidroxilo.

A nivel biológico, el proceso de formación del radical hidroxilo más importante es la reacción de Fenton (Fenton, 1894) (Reacción 4).



Reacción 4. Formación del radical hidroxilo. Reacción de Fenton.

También a partir del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber y cols., 1932) (Reacción 5):

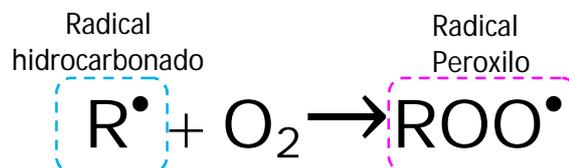


Reacción 5. Formación del radical Hidroxiilo. Reacción de Haber-Weiss.

Esta reacción es catalizada por metales como el hierro o el cobre.

### 3.1.5 Radical peroxilo (ROO•).

Los radicales peroxilos son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, no siendo tan reactivos como otras especies de ROS. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado (Reacción 6). Este radical tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).



Reacción 6. Producción del radical peroxilo.

### 3.1.6 Oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ).

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno en presencia de foto-activadores como la riboflavina<sup>14</sup>. Su vida media es alrededor de  $10^{-6}$  segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostaglandin sintetasa, entre otras.

### 3.1.7 Óxido nítrico ( $^{\cdot}\text{NO}$ ).

Es un gas poco soluble en agua, de una vida media de 3 a 5 segundos. Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS Por sus siglas en ingles). Dicha enzima presenta tres isoformas: la neuronal nNOS (tipo I) y la endotelial eNOS (tipo III), ambas se expresan constitutivamente y su actividad está regulada por la concentración intracelular de calcio<sup>15</sup>, <sup>16</sup>. La inducible iNOS (tipo II) la expresan los macrófagos cuando son estimulados por citocinas, lipopolisacáridos u otros factores solubles que intervienen en la regulación de las células pertenecientes al

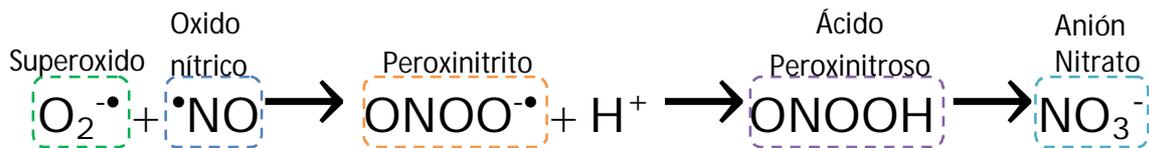
sistema inmune, siendo su expresión regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, en lo cual participan factores de transcripción sensibles al estado redox como el factor nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) o las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPcinasas)<sup>17</sup>. El óxido nítrico juega un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor y se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria. Otro efecto del  $\cdot$ NO reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo, puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y rupturas del DNA, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El  $\cdot$ NO posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble efecto se propone que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste tiene efectos directos sobre una molécula biológica<sup>18</sup>, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de  $\cdot$ NO es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de  $\cdot$ NO aumentan, tiene efectos indirectos, a través de los

metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

### 3.1.8 Peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

El óxido nítrico puede generar anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) al reaccionar con el anión superóxido<sup>19, 20</sup> (Reacción 7):



Reacción 7. Formación del anión peroxinitrito.

El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado ( $\text{ONOOH}$ ). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de nitrar residuos de tirosina, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar el DNA<sup>21, 22</sup>.

La producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{NO}$  *in vivo* es diferente, y la producción de peroxinitrito ocurre siempre con exceso de uno o de otro<sup>18</sup>. Algunos autores establecen que tanto las reacciones de oxidación como de nitración mediadas por el peroxinitrito están influidas en gran medida por el flujo de producción relativo de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{NO}$ <sup>23</sup>.

También se establece que las más altas tasas de oxidación se producen con exceso de  $\cdot\text{NO}$ , produciéndose la oxidación a través del  $\cdot\text{OH}$  y del  $\cdot\text{NO}_2$  formados a partir del peroxinitrito. Sin embargo, la reacción del peroxinitrito con el  $\text{CO}_2$  es la vía más importante por la que se descompone el peroxinitrito *in vivo*<sup>24</sup>, formando al final  $\text{N}_2\text{O}_3$ , que es un potente agente nitrante.

Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina<sup>25, 26</sup>. Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el  $\cdot\text{NO}$  para formar 3-nitrotirosina. La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , debido a la competencia entre éste y el  $\cdot\text{NO}$  por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  superara la de  $\cdot\text{NO}$ <sup>25, 26</sup>. Asimismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sin la consiguiente formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio<sup>27, 28</sup>.

### 3.1.9 Fuentes de radicales libres.

Existen diversos mecanismos por los cuales el organismo se expone a los radicales libres derivados del oxígeno provocando diferentes efectos. Los radicales libres pueden producirse a través de diversos procesos químicos, tanto dentro como fuera del organismo. Es importante resaltar, que una misma célula tiene potencialmente más de una fuente de producción de radicales libres. De acuerdo al origen de su producción, se puede clasificar a las fuentes en exógenas y endógenas<sup>29</sup>:

#### Fuentes exógenas.

- 1) Agentes antineoplásicos<sup>30</sup>: algunos de los efectos de estas drogas como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos<sup>31</sup> que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad, se les ha atribuido la capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
  
- 2) Exposición a radiaciones electromagnéticas (rayos X y gamma) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas a y b)<sup>32</sup>.

3) Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, pesticidas, humo de tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación<sup>33</sup>.

Fuentes endógenas.

1) Autooxidación de pequeñas moléculas.

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del oxígeno por estas moléculas<sup>34</sup>.

Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido-dismutasa (SOD).

## 2) Enzimas solubles y proteínas.

Enzimas como xantina oxido reductasa, aldehído oxidasa, flavinproteína deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico<sup>35</sup>.

## 3) Cadena de transporte de electrones mitocondrial.

En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias. Esto se debe a que son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular.

La mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procede de la dismutación del radical superóxido<sup>36</sup>. La generación del radical superóxido por la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna, están reducidos<sup>37</sup>.

De los cuatro complejos responsables del transporte de electrones en la cadena respiratoria, se ha observado la producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en el complejo I<sup>37</sup> y en el Complejo III<sup>36</sup>. En el caso del complejo I, los candidatos más probables como generadores de radicales libres parecen ser los centros hierro-sulfurados, mientras que en el caso del complejo

III se ha debatido intensamente sobre si podrían corresponder a la semiquinona<sub>36</sub> o al citocromo b<sub>38</sub>.

4) Sistemas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y membrana nuclear.

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen citocromos P450 y b5 que pueden oxidar ácidos grasos insaturados<sub>39</sub> y xenobióticos<sub>40</sub>. De hecho, los citocromos P450 son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez por radicales) que pueden ser liberada en la célula<sub>41, 42</sub>.

5) Peroxisomas.

Los peroxisomas son fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas; ninguna de estas utiliza al superóxido como precursor del mismo. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa y la acil-graso-coenzima A oxidasa<sub>7</sub>.

La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas<sup>29, 43</sup>.

#### 6) Membrana plasmática.

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de la misma, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales<sup>29</sup>.

### 3.2 Sistemas Antioxidantes

Los sistemas antioxidantes pueden ser endógenos y exógenos, los cuales contrarrestan la actividad de los radicales libres de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés) manteniendo así el equilibrio óxido-

reducción. Los sistemas antioxidantes endógenos más importantes son: las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

### 3.2.1 Sistemas endógenos.

#### 3.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).

La función catalítica de la SOD fue descubierta por Fridovich McCord en el año de 1968, la SOD es una enzima que cataliza la reducción del anión superóxido, es producido en el organismo como producto resultante del inicio de la reducción de una molécula de  $O_2$  y de la fosforilación oxidativa, o bien derivado de la radiación UV y durante la inflamación, transformando al anión superóxido en un producto menos reactivo como es el peróxido de hidrógeno. En la descomposición del peróxido de hidrógeno participan la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT).

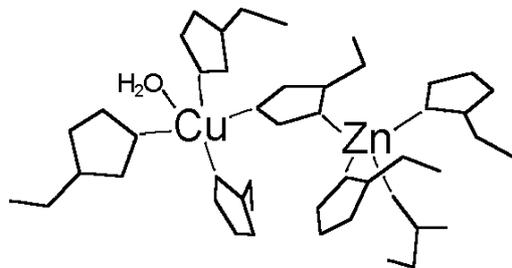


Figura 1. Estructura del sitio activo de la SOD Cu/Zn, basada su estructura cristalina.

La SOD está presente en diferentes formas: SOD cobre/zinc(Cu/Zn-SOD)(fig.1) y la SOD manganeso (Mn-SOD). La Cu/Zn-SOD se encuentra en el citosol y en la membrana celular, tiene un peso molecular de 32 KDa con dos subunidades idénticas. La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial<sup>18,44,45</sup> y tiene un peso molecular de 88 KDa con cuatro subunidades idénticas<sup>45</sup>, actúa como primera línea de defensa en la detoxificación del anión superóxido y parece estar implicada en procesos como la supresión tumoral o la diferenciación celular.

### 3.2.1.2 Glutación peroxidasa.

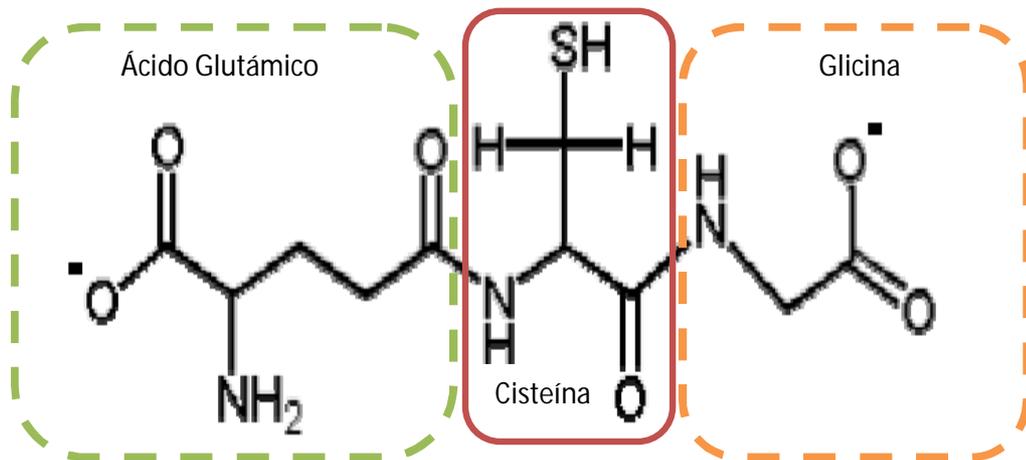


Figura 2. Estructura del Glutación (GSH).

El sistema de glutatión como antioxidante está formado por el glutatión reducido y por la actividad de la enzima glutatión reductasa que reduce al glutatión oxidado.

El glutatión (GSH) (Figura 2) es un tripéptido compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina la cual cuenta con numerosas funciones importantes dentro de las células. El glutatión sirve como agente reductor, se conjuga con xenobioticos para hacerlos más hidrosolubles, está involucrado en el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares (el ciclo de  $\gamma$ -glutamil), es un sustrato para péptidos-leucotrienos, sirve como un cofactor para algunas reacciones enzimáticas y como una ayuda en la reorganización de puentes disulfuro en las proteínas.

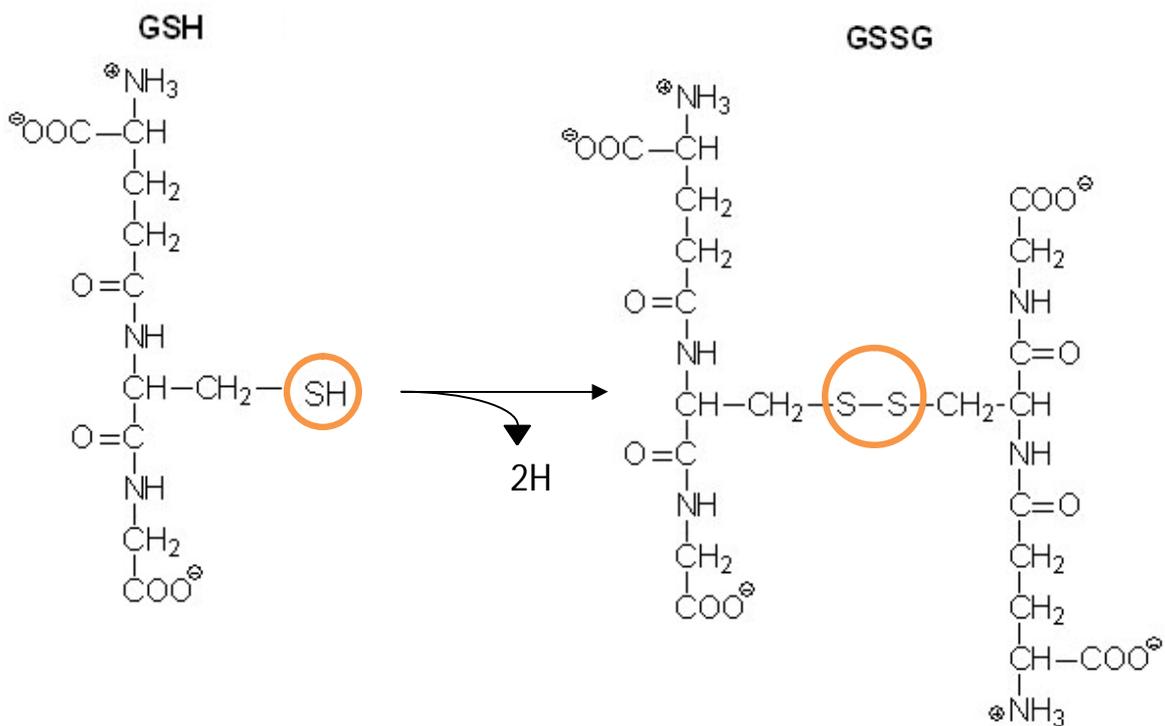


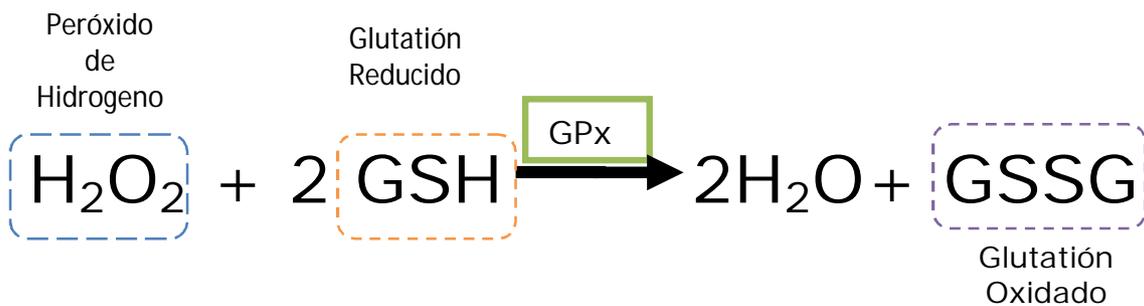
Figura 3. Estructura de GSH (Glutatión reducido) y estructura del GSSG (Glutatión oxidado).

El papel de GSH, como agente reductor es muy importante sobre todo en el ambiente altamente oxidante de los eritrocitos. El grupo sulfhidrilo del GSH se puede utilizar para reducir los peróxidos formados durante el transporte de oxígeno. La forma resultante de

GSH oxidado consta de dos moléculas de disulfuro unidos entre sí GSSG (abreviado) (Fig.3).

La glutatión reductasa utiliza NADPH como cofactor para reducir GSSG de nuevo a dos moles de GSH. Por lo tanto, la vía de las pentosas fosfato es una vía muy importante de los eritrocitos para la producción continua de la NADPH necesario para la glutatión reductasa.

La glutatión peroxidasa, es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del  $H_2O_2$  (Reacción 8) o lipoperóxido (L-OOH), utilizando al glutatión reducido (GSH).



Reacción 8. Catálisis de la reducción del peróxido de hidrógeno.

El glutatión oxidado es reducido por la glutatión reductasa (GRd) que utiliza NADPH (proveniente de la vía pentosa fosfato en el eritrocito) como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH / GSSG (Fig.4).

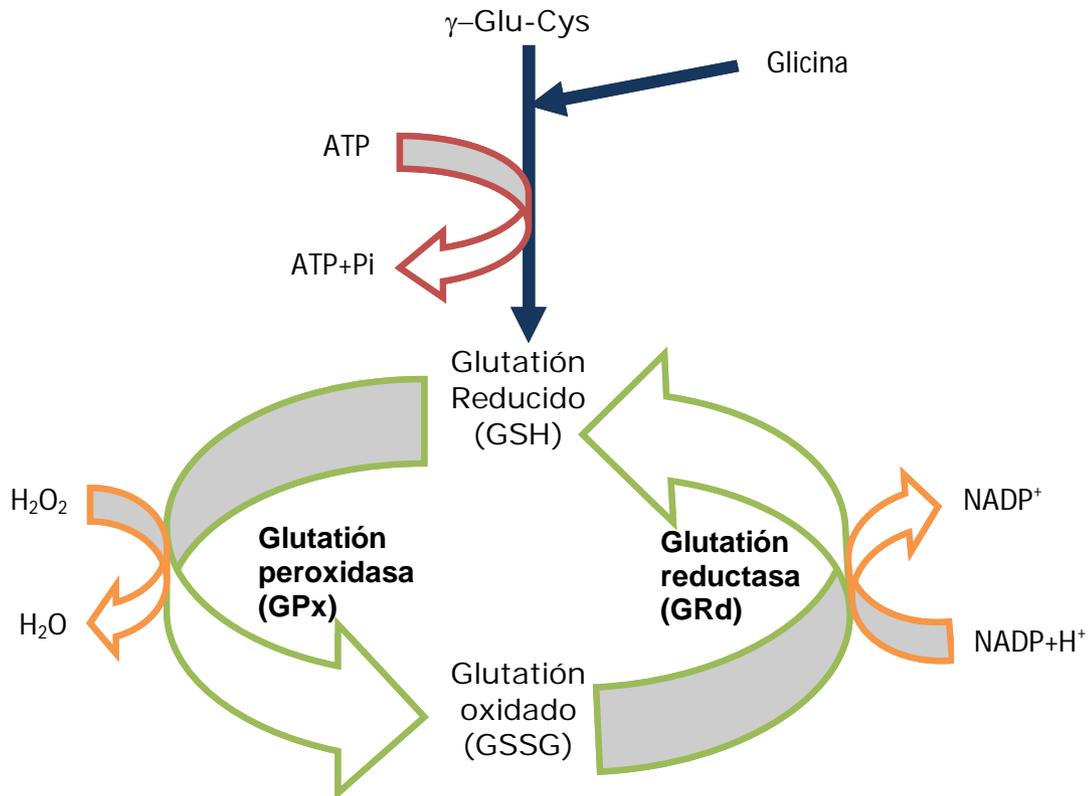


Figura 4. Ciclo del Glutati3n.

Existen al menos tres formas de glutati3n peroxidasa selenio dependiente: una forma intracelular o celular (GPx-C), una extracelular o plasmática (GPx-P) y otra con actividad espec3fica para los fosfolipoper3xidos (GPx-PH), que por lo general est3 asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, posee diferencias estructurales. La GPx-C y la GPx-P son enzimas tetram3ricas; est3n compuestas por cuatro subunidades id3nticas entre s3 y cada una de 3stas contiene un 3tomo de selenio unido covalentemente a una mol3cula de ciste3na. La secuencia de amino3cidos de las subunidades de la GPx-C es diferente a la secuencia de la GPx-P. Las subunidades por separado no presentan actividad catal3tica; sin

embargo, la GPx–PH es una enzima monomérica que también posee un átomo de selenio y presenta actividad catalítica<sup>46, 47</sup>.

La GPx–C tiene mayor afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que por los lipoperóxidos, en tanto la GPx–P tiene una afinidad semejante para los dos sustratos. La GPx–C y la GPx–P utilizan como sustratos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a los lipoperóxidos; sin embargo, no son capaces de utilizar los fosfolipoperóxidos (PHL–OOH) que son los sustratos principales para la GPx–PH<sup>46, 48</sup>.

### 3.2.1.3 Catalasa (CAT).

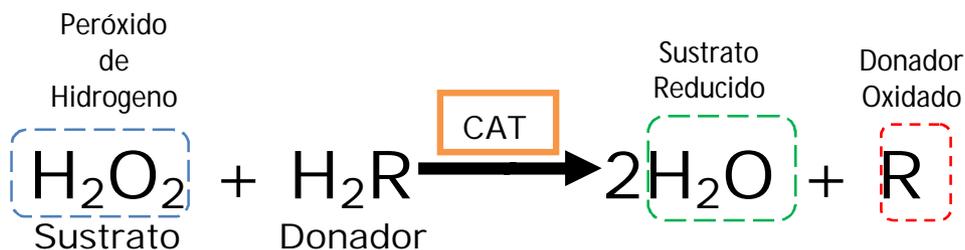
(Peróxido de Hidrógeno Oxidorreductasa)

Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía dependiendo del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso.

A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica; consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no

covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX.

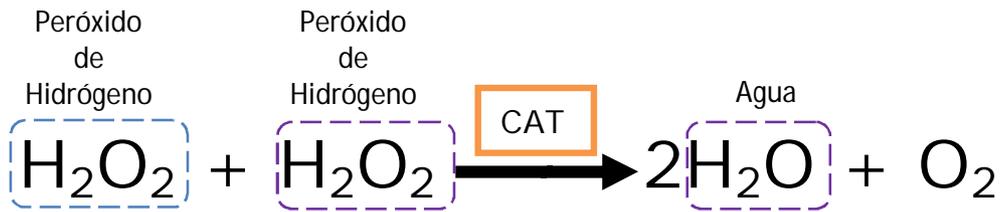
La catalasa está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa (Reacción 9). Ambas se pueden representar por la ecuación:



Reacción 9. Destrucción del peróxido de hidrógeno por la catalasa.

La reacción general abarca la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por un donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado.

En la reacción catalítica, el donador es otra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reacción 10). Esta reacción sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica.



Reacción 10. Reacción catalítica de la enzima catalasa sobre el peróxido de hidrógeno.

En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donantes de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, formol y formaldehído. Esta reacción se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrámeros.

La Glutación Peroxidasa (GPx) y la Glutación Reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx / GRd), y la Catalasa de otro (SOD / CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas.

### 3.2.2 Sistemas exógenos.

Algunas vitaminas antioxidantes, junto con el glutatión, conforman un grupo de agentes reductores capaces de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo destructor de estos<sup>49</sup>.

Los sistemas antioxidantes exógenos más significativos son: las vitaminas A, C, E y algunos metales como el cobre y el selenio, éste último actúa como cofactor de la enzima Glutathion Peroxidasa.

Vitamina A (Retinol).

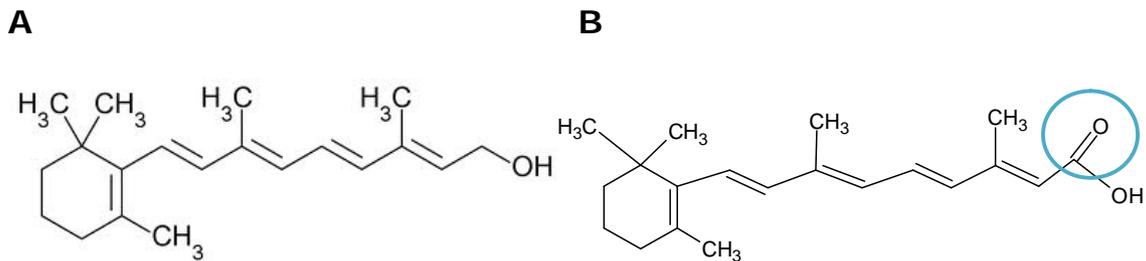


Figura 5. Estructura de la Vitamina A, su forma reducida Retinol **(A)** y en su forma oxidada Ac. Retinoico **(B)**.

La vitamina A (Fig.5) la cual es esencial para el hombre, puede derivar del retinol de origen animal y del que proviene de los carotenos de distintos vegetales. Las principales fuentes de vitamina A son aceites de hígado de algunos pescados, hígado de mamíferos y

leche. Existe en los vegetales en forma de caroteno (provitamina). Tiene una función importante en la visión. En forma de ácido retinoico, es eficaz en el tratamiento del acné y otras afecciones dermatológicas.

Vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol).

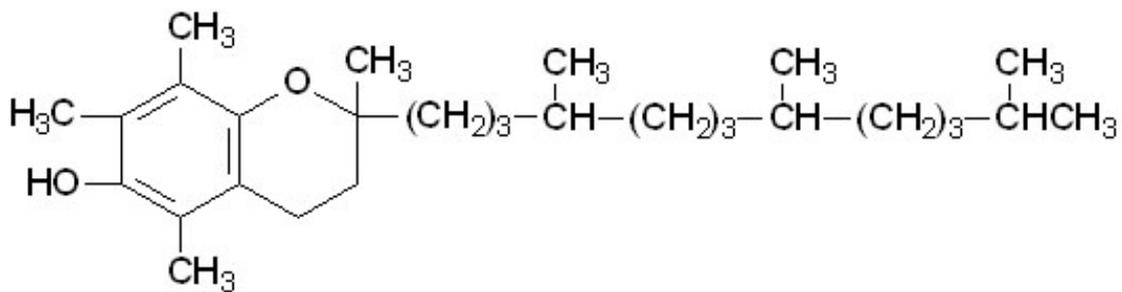
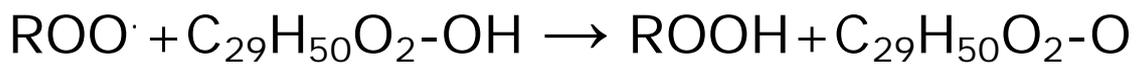


Figura 6. Estructura de la vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol).

La vitamina E (Fig.6) es un lípido isoprenoide sustituido, de la familia de los tocoferoles. Su forma biológicamente activa es el D – alfa tocoferol, cuyo hidroxilo fenólico es responsable de la reducción antioxidante. Esta vitamina es abundante en la yema del huevo, la leche entera, las vísceras de mamíferos y los aceites de pescados; el hombre debe ingerirla de modo esencial<sup>50</sup>.

La actividad de la vitamina E es una de las primeras barreras de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Los fosfolípidos de

las membranas mitocondrial, del retículo endoplasmático y plasmática poseen afinidades para el alfa-tocoferol, por lo que está muy concentrado en estos sitios<sup>51</sup>. Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadena con radicales libres como resultado de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre, quedando, a la vez, en la forma de radical libre fenoxi o fenoxilo, en reacciones intermedias no reversibles (Reacción 11 y 12) que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo:



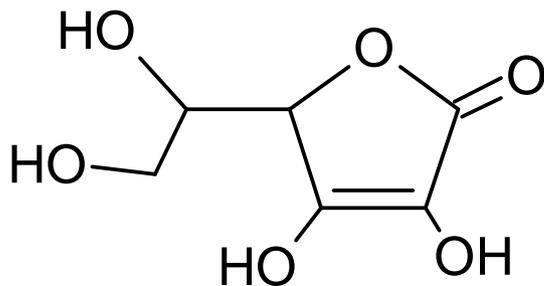
Reacción 11 y 12. Transformación de la vitamina E.

Los tocoferoles y el selenio actúan sinérgicamente, lo que permite al organismo disponer de su actividad antioxidante aunque uno esté disminuido<sup>52</sup>. De hecho, el selenio es requerido para la función pancreática normal<sup>53</sup>, la cual es necesaria para la correcta digestión de los lípidos. Por otra parte, aunque ya es conocido que el consumo de vitamina E está en franca correlación con la disponibilidad para digerir y absorber lípidos debido a su naturaleza hidrofóbica (se ha

comprobado la deficiencia de tocoferoles en procesos como la colestasis hepática y la fibrosis quística). Trabajos recientes demuestran la estrecha relación del incremento del requerimiento de la vitamina y del selenio con la ingestión de ácidos grasos insaturados, el envejecimiento<sup>54</sup> y el padecimiento de patologías crónico-degenerativas como la aterosclerosis<sup>55</sup>, el mal de Alzheimer<sup>56</sup> o el carcinoma prostático<sup>54</sup>.

Vitamina C.

**A**



**B**

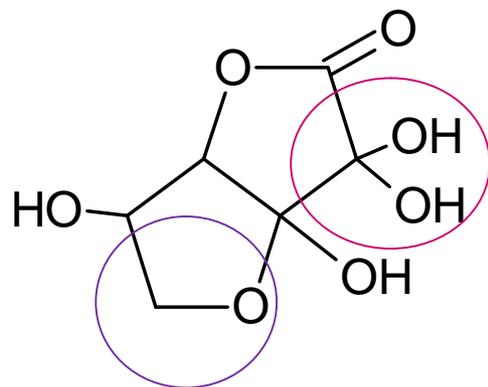


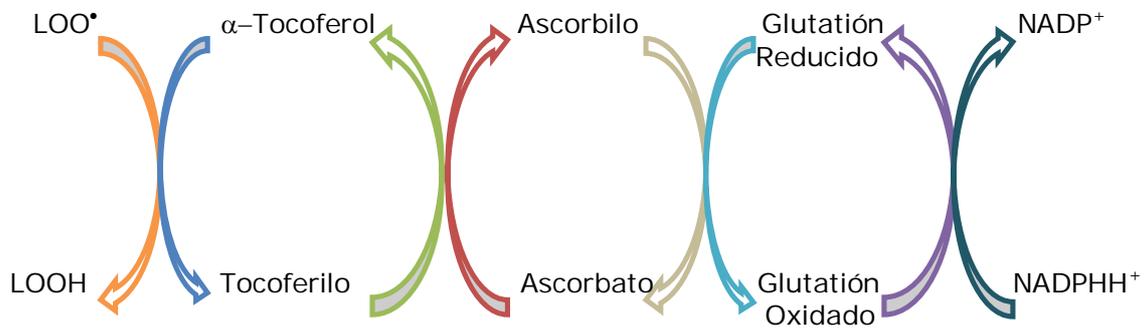
Figura 7. Estructura de la Vitamina C, su forma reducida ácido ascórbico **(A)** y en su forma oxidada ácido dehidroascórbico **(B)**.

*La vitamina C* o L-ascorbato (Fig.7) es un derivado ácido de la glucosa. Su obtención en la dieta es esencial para el hombre. Presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilos asociados al doble enlace funcionan como agentes con alto potencial reductor, lo que le permite, incluso, participar en la reducción directa

del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas<sup>50</sup>.

El mecanismo molecular de acción de esta vitamina la sitúa en un alto nivel antioxidante, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la digestión<sup>57</sup>; además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad de la vitamina E, restableciéndola<sup>49</sup>.

Las vitaminas C y E, así como la A, se clasifican como *antioxidantes interruptores*, porque actúan interrumpiendo la reacción en cadena de la formación de radicales libres<sup>58</sup>, atrapándolos y reduciéndolos, a diferencia de los *antioxidantes preventivos* (entre los que se encuentran las enzimas peroxidasas), que evitan la iniciación de la secuencia de reacciones. Los tocoferoles funcionan en un ambiente de alta presión parcial de oxígeno, mientras que los betacarotenos lo hacen a presiones bajas.



$LOO^{\bullet}$ : Radical peroxilo;

$LOOH$ : Lipoperoxido;

$NADP^+$ : Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada);

$NADPH H^+$ : Nicotinamín adenin dinucleótido fosfato (forma reducida).

Figura 8. Acción del tocoferol sobre peróxidos lipídicos y su regeneración en presencia de ascorbato y glutatión reducido.

### 3.3 Marcadores de estrés oxidativo.

A pesar de que los radicales libres son difíciles de medir por su alta reactividad y su corta vida media, existen marcadores directos e indirectos, para valorar el estrés oxidativo.

Los marcadores indirectos de estrés oxidativo están relacionados con el estado de las enzimas y sustancias antioxidantes que proporcionan información sobre dicho estado.

Un aumento del estrés oxidativo puede ser consecuencia de tres condicionantes:

- a) Un aumento mantenido de los radicales libres de oxígeno o de nitrógeno que superen a los mecanismos de defensa.
- b) Una disminución de la defensa antioxidante,
- c) La acción conjunta de ambos mecanismos.

### 3.4 Tejido Sanguíneo

Es un líquido ligeramente alcalino (pH 7.4), que constituye alrededor de 7% del peso corporal. La sangre desempeña numerosas funciones, entre ellas el transporte de gases como el O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, de moléculas nutritivas, traslado de los desechos del metabolismo para su eliminación, transportar a las hormonas y electrolitos a sus destinos finales<sup>62</sup>, pero la sangre también puede transportar agentes xenobioticos químicos y biológicos.

Los componentes de la sangre

La sangre está formada por una fracción celular, denominada elementos formes (eritrocitos, leucocitos, plaquetas) y una fracción líquida, denominada plasma. Cuando se centrifuga una muestra de sangre, los elementos formes se acumulan en el fondo del tubo, dejando el plasma en la parte superior, los elementos formes constituyen aproximadamente el 45% del total del volumen sanguíneo y el plasma supone el 55% restante<sup>62</sup>.

El plasma sanguíneo es un fluido blanquecino que se obtiene al separar los componentes celulares casi siempre por centrifugación; contiene agua, sales minerales, iones, glucosa, aminoácidos y proteínas de varios tipos tales como: fibrinógeno, albúmina y

globulina y otras sustancias como vitaminas y hormonas que transporta por todo el organismo<sup>62</sup>.

### 3.5 Elementos formes

Los elementos formes de la sangre comprenden dos tipos de células sanguíneas: los eritrocitos o glóbulos rojos, los leucocitos o glóbulos blancos y las plaquetas.

Tabla 3. Elementos de la sangre.

Sangre		
Elementos formes	Glóbulos rojos	Eritrocitos
	Glóbulos Blancos o Leucocitos	Neutrófilos
		Eosinófilos
		Basófilos
		Linfocitos
		Monocitos
Plaquetas		
Plasma	Proteínas	Albumina, $\alpha_1$ -globulinas, $\alpha_2$ -globulinas, $\beta$ -globulinas, $\gamma$ -globulinas
	Electrolitos	$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , etc.
	Metabólitos	Glucosa, Lactato, Piruvato, Urea, Ac. Úrico, Creatinina, Aminoácidos, Amoníaco, Lípidos, Triacilgliceroles, colesteroles, etc.

### 3.5.1 Eritrocitos (Glóbulos rojos).

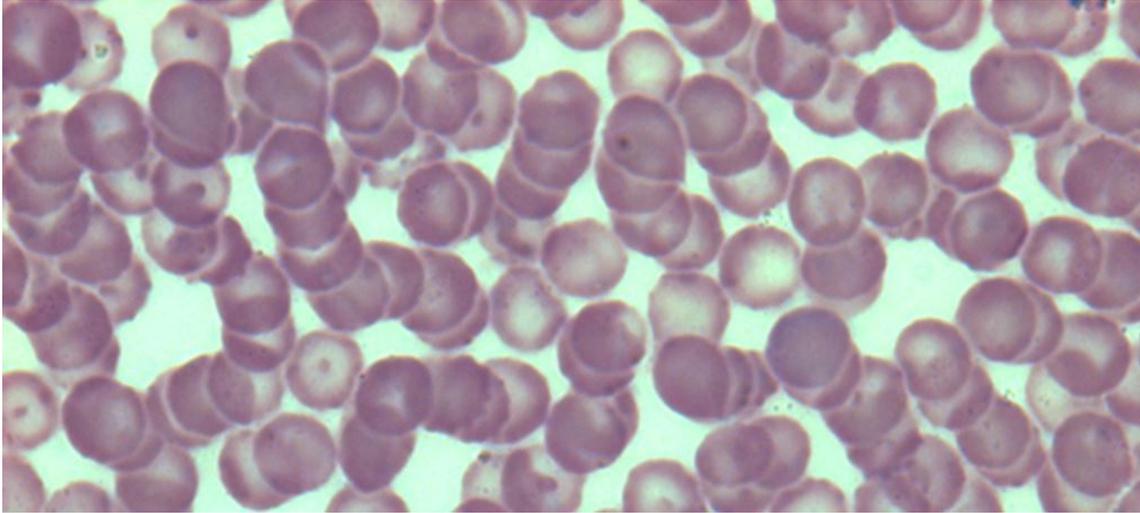


Figura 9. Fotomicrografía de frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Los eritrocitos (Fig.9) transportan oxígeno, carecen de núcleo y de mitocondrias, son células pequeñas, y bicóncavas, son el elemento forme cuantitativamente más numeroso de la sangre, contienen hemoglobina la cual es responsable del color rojo característico de la sangre y se encarga del intercambio de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ).

Los eritrocitos contienen en su interior hemoglobina lo que les ayuda a cumplir su función transportadora, cada hemoglobina tiene cuatro grupos hemo, donde está incorporado el hierro, y cuatro cadenas de globina. En los hematíes normales del adulto, la hemoglobina A1 (alfa2-beta2) constituye el 97%, casi un 3% de hemoglobina A2

(alfa2-delta2) y menos de un 1% de hemoglobina fetal o F (alfa2-gamma2).

### 3.5.2 Glóbulos blancos o leucocitos.

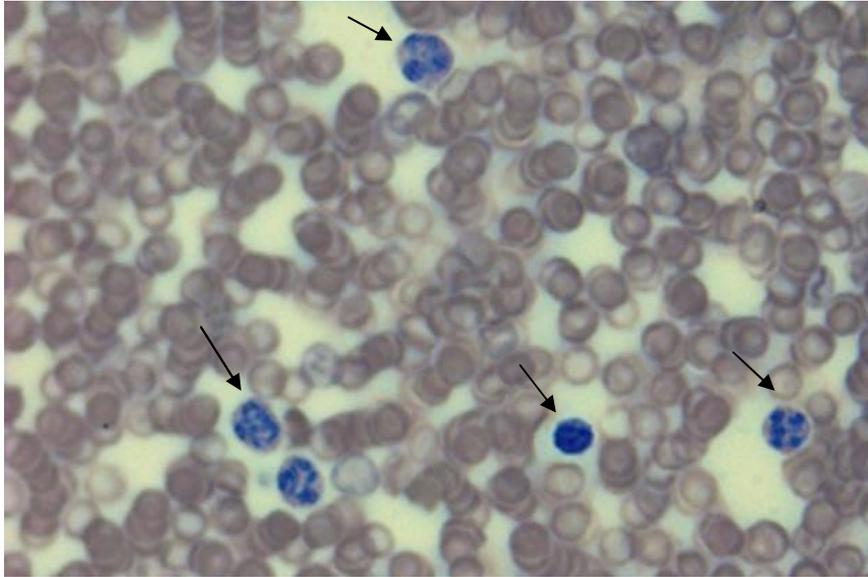


Figura 10. Fotomicrografía de frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x. → muestra glóbulos blancos.

A diferencia de los eritrocitos, los glóbulos blancos (Fig. 10) son mucho menos numerosos dentro del torrente sanguíneo y lo utilizan como medio para desplazarse, en general cuando estos llegan a su destino, dejan la circulación y migran por diapédesis al tejido contiguo y llevan a cabo sus funciones como: fagocitosis, destrucción de bacterias, mediación de reacciones inflamatorias, etc. Los leucocitos son redondos y protegen al cuerpo de sustancias extrañas,

un incremento de los mismos, indica la presencia de alguna infección<sub>62</sub>.

Los leucocitos se clasifican en dos grupos:

- 1) Granulocitos: Los que poseen gránulos específicos en su citoplasma, se diferencian según sea el color de sus gránulos al ser teñidos: Neutrófilos (ligeramente purpura), Eosinófilos (rojos), Basófilos (azules).
- 2) Agranulocitos: Los que carecen de gránulos específicos y pueden ser de dos tipos: Linfocitos y Monocitos.

En la siguiente tabla, se muestran las características de ambos grupos de leucocitos.

Tabla 4. Características de granulocitos y agranulocitos.

Características	Granulocitos			Agranulocitos	
	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
Núcleo	Tres a cuatro lóbulos	Dos lóbulos	Forma de S	Redondo	Forma de riñón
Contenido de gránulos específicos	Colagenasa tipo IV, fosfolipasa A <sub>2</sub> , lactoferrina, lisozima, fagocitina, fosfatasa alcalina, proteína fijadora de vitamina B <sub>12</sub> .	Arilsulfatasa, histaminasa, glucoronidasa b, fosfatasa ácida, fosfolipasa, proteína básica mayor, proteína catiónica de eosinófilo, neurotoxina, ribonucleasa, catepsina, peroxidasa.	Histamina, heparina, fator quimiotáctico de eosinófilos, fator quimiotáctico de neutrófilos, peroxidasa, proteasas neutras, sulfato de condroitina.	Ninguno	Ninguno.
Función	Fagocitosis y destrucción de bacterias	Fagocitosis del complejo de antígeno-anticuerpo; destrucción de parásitos	Mediación de reacciones inflamatorias	Células T: reacción inmunitaria mediación celular. Células B: Reacción inmunitaria de mediación tumoral	Se diferencian en macrófago: fagocitosis, presentación de antígenos.

### 3.5.3 Neutrófilos.



Figura 11. Fotomicrografía de neutrófilos en frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Son el tipo más abundante de leucocitos, suponen del 60% al 70% de estos, tienen de 9 a 12 micrómetros de diámetro y un núcleo multilobular (Fig.11).

Dentro del citoplasma del neutrófilo se encuentran distintos tipos de gránulos: 1) los específicos que contienen enzimas y/o sustancias que proveen de funciones antimicrobianas y 2) los gránulos azurofilos que son lisosomas que contienen hidrolasas ácidas, lisozima y otras proteínas bactericidas.

## Funciones.

Interactúan con agentes quimiotácticos para migrar a sitios donde hay microorganismos, destruyéndolos mediante fagocitosis y por la liberación de enzimas hidrolíticas. Además sintetizan leucotrienos a partir del ácido araquidónico proveniente de las membranas celulares de los neutrófilos, iniciando de esta manera el proceso inflamatorio.

Una vez que llevan a cabo su función de destruir microorganismos, mueren por apoptosis y son eliminados por los macrófagos para evitar la posible liberación de su contenido citotóxico al medio extracelular, hecho que ocurre en caso de muerte por necrosis.

### 3.5.4 Eosinófilos.



Figura 12. Fotomicrografía de eosinófilos en frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Constituyen menos del 4% de la población total de glóbulos blancos, tienen de 10 a 14 micrómetros de diámetro.

Los eosinófilos (Fig.12) poseen dos tipos de gránulos: específicos y azurofilos; los gránulos específicos poseen dos regiones, una interna y otra externa. La región interna contiene proteína básica mayor, proteína eosinofílica catiónica y neurotoxina derivada del eosinófilo la cual puede dañar severamente las neuronas mielinizadas, las dos primeras son altamente eficaces para combatir parásitos<sup>62</sup>.

Los gránulos azurofilos contienen lisosomas que contienen enzimas hidrolíticas similares a las de los neutrófilos y funcionan tanto en la destrucción de gusanos parasitarios como en la hidrólisis de complejos antígeno anticuerpo.

Funciones.

La migración de estos al sitio de reacciones alérgicas e inflamatorias o de invasión de parásitos por unión de histamina, leucotrienos y factor quimiotáctico a receptores del eosinófilo liberan sustancias que desactivan los iniciadores farmacológicos de la reacción inflamatoria, como histamina y leucotrieno C.

### 3.5.5 Basófilos.

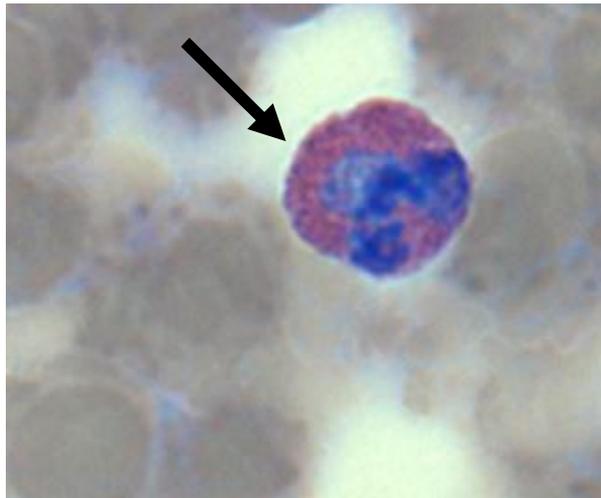


Figura 13. Fotomicrografía de basófilos en frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Constituyen menos del 1% de la población total de los leucocitos, tienen de 8 a 10 micrómetros de diámetro, tienen varios receptores de superficie, incluidos los receptores de inmunoglobulina E.

Los basófilos contienen dos tipos de gránulos (Fig.13): 1) los que contienen heparina, histamina, factor quimiotáctico de eosinófilos, factor quimiotáctico de neutrófilos, proteasas neutras, sulfato de condroitina y peroxidasa y 2) los gránulos azurofilos que contienen enzimas similares a las de los neutrófilos.

## Funciones.

La unión del antígeno a las moléculas de IgE en la superficie del basófilo propicia la liberación del contenido de los gránulos al espacio extracelular, la enzima fosfolipasa A genera residuos de ácido araquidónico que producen factores químicos mediadores de la respuesta inflamatoria, estos factores son el factor activador de plaquetas, leucotrieno B<sub>4</sub>, prostaglandina D<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>, leucotrieno C<sub>4</sub>, leucotrieno D<sub>4</sub>, leucotrieno E<sub>4</sub>, adenosina, bradicinina, superóxido, TNF-alfa. IL-4, IL-5, IL-6 y factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos. La liberación de histamina causa vasodilatación, relajación del musculo liso, aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la liberación de leucotrienos activa a los leucocitos y da lugar a la migración al sitio antigénico<sup>62</sup>.

### 3.5.6 Linfocitos.

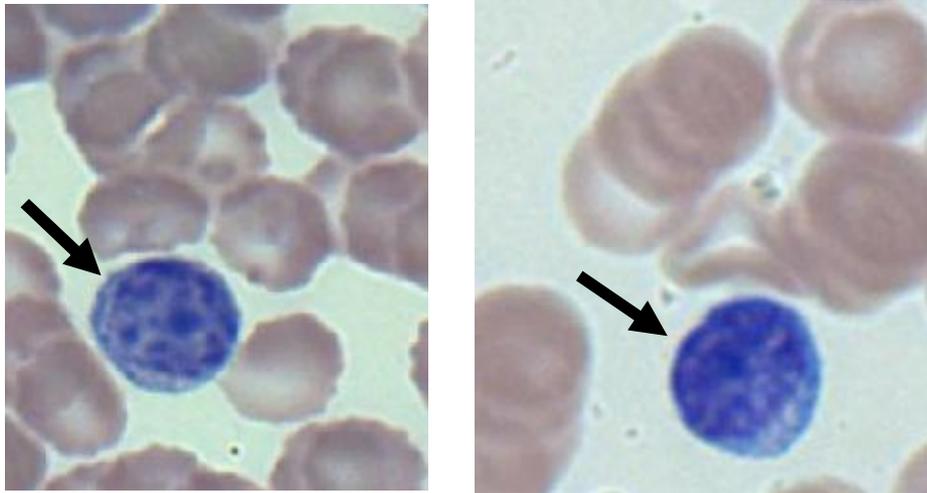


Figura 14. Fotomicrografía de linfocitos en frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Constituyen del 20 al 25% de la población total circulante de leucocitos, miden de 8 a 10 micrómetros de diámetro (Fig.14). Los linfocitos se dividen en tres: Linfocitos B, linfocitos T y las células asesinas naturales o natural killer por su nombre en inglés.

Los linfocitos provienen de un progenitor linfoide (Fig.15) en la médula ósea que da lugar a precursores que darán Linfocitos B, los precursores que migran al timo darán Linfocitos T y también pueden dar lugar a células asesinas naturales (natural killer, linfocitos sin receptor).

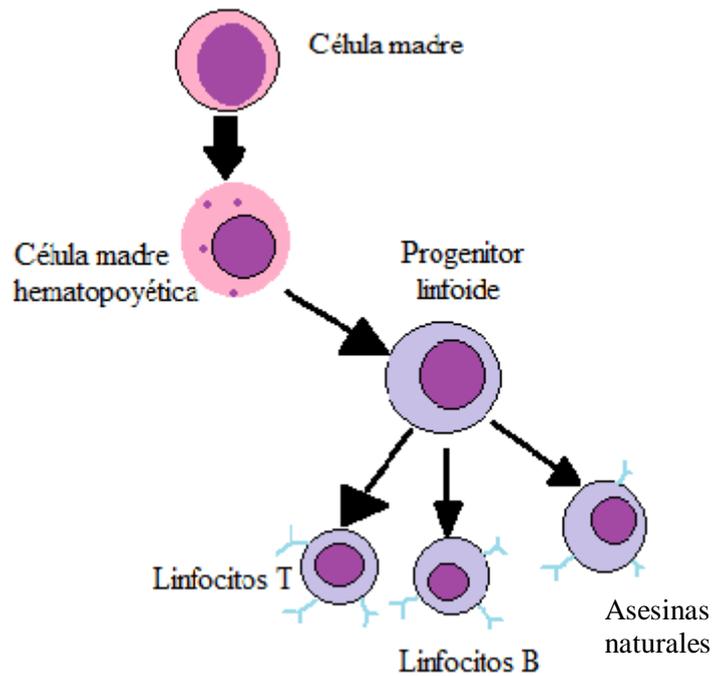


Figura 15. Origen hematopoyético de los linfocitos.

Luego de su maduración migran al sistema linfoide donde forman clonas y todos los clones actúan contra un antígeno específico. Después de una estimulación por un antígeno los linfocitos B y T se diferencian en células de memoria y células efectoras<sup>62</sup>.

Funciones.

Los linfocitos T participan en la activación de los linfocitos B y la secreción de anticuerpos, pueden inactivar la propagación de patógenos y favorecer su eliminación. También pueden activar la capacidad microbicida de los macrófagos, la acción de los linfocitos T puede inducir también la función de las células asesinas naturales,

que eliminan células infectadas o transformadas e indirectamente la degranulación de células cebadas y eosinófilos, cuyos gránulos favorecen la eliminación de parásitos.

Alrededor del 80% de los linfocitos circulantes son células T, 15% células B y el resto son células asesinas naturales o natural killer; algunas células T pueden vivir durante años, mientras que las células B solo unos meses.

#### 3.5.7 Monocitos.



Figura 16. Fotomicrografía de monocitos en frotis de sangre periférica de ratas control. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x.

Son las células más grandes de la sangre circulante (Fig.16), tienen de 12 a 15 micrómetros de diámetro constituyen de 3 a 8 % de la población de leucocitos<sup>62</sup>.

## Funciones.

Permanecen en circulación unos cuantos días; a continuación migran a través del endotelio y se diferencian en macrófagos, los cuales fagocitan y destruyen células muertas, antígenos y material extraño (bacterias), esta destrucción ocurre dentro de los fagosomas, tanto por digestión enzimática como por la formación de superóxido, peróxido de hidrogeno y acido hipocloroso, los macrófagos también producen citocinas que activan la respuesta inflamatoria y la proliferación y maduración de otras células<sup>62</sup>.

#### 4. Hipótesis.

- La exposición crónica a bajas dosis de ozono conduce a un estado de estrés oxidativo, entonces disminuye la actividad de la enzima SOD Cu/Zn y se induce la activación de los leucocitos y se observa cambio en la morfología de los mismos.

## 5. Objetivo.

### Objetivo general.

- Estudiar el efecto de la exposición crónica a ozono sobre la actividad de la enzima SOD Cu/Zn y en la activación de leucocitos así como los cambios en su morfología.

## 6. Materiales y métodos.

### 6.1 Animales

Se utilizaron 30 ratas machos de la cepa Wistar entre 250 y 300g de peso, los cuales fueron alojados en cajas individuales con libre acceso a agua y comida.

### 6.2 Exposición a ozono.

Los 30 animales fueron divididos al azar en 5 grupos experimentales y cada grupo de 6 ratas, estuvo expuesto dentro de cámaras a 0.25 ppm de ozono 4 horas diarias durante 15, 30, 60 y 90 días, el grupo control fue expuesto a aire en los tiempos antes señalados, la exposición se llevó a cabo de las 8:00 a las 12:00 horas, mientras la limpieza de las cajas se llevaba a cabo.

### 6.3 Método de recolección de muestras

Los animales se sacrificaron por decapitación, se tomó una gota para la realización de los frotis para hacer la tinción de Wright y el resto de la muestra sanguínea se recolectó en tubos con heparina y se obtuvo un promedio de 6mL de sangre por rata, se centrifugó a 3300 rpm a 4°C durante 15 minutos, separando de esta manera el plasma, con el

cual se hizo espectrometría para cuantificar la actividad de la enzima superóxido-dismutasa de Cu/Zn y el western blot para la superóxido-dismutasa.

#### 6.4 Tinción de Wright.

1. Hacer el frotis de sangre.
2. Dejar secar por 24 hrs.
3. Fijar el frotis con alcohol metílico durante 5 minutos, cuidando que el frotis nunca se seque.
4. Cubrir el frotis con el colorante Wright (previamente filtrado), dejar actuar por 5 minutos no dejar que se seque, decantar el exceso de colorante.
5. Sumergir los frotis de 3 a 4 veces en el siguiente orden:
  - Alcohol 96%.
  - Alcohol 100%.
  - Xilol<sub>1</sub>.
  - Xilol<sub>2</sub>.

El primer lavado de xilol, sirve para eliminar el excedente de alcohol.

6. Cubrir el frotis poniendo una gota de resina con un aplicador de madera y se colocando un cubreobjetos. Dejar secar hasta el día siguiente.

Modificación de la técnica de Tinción de Wright tomada de Hematology: Principles and procedures, Sixth Edition, Brown AB, Lea & Febiger, 1993, pg. 101.

## 6.5 Western Blot.

### Cuantificación de proteínas.

Se tomó el plasma que se obtuvo después de la centrifugación, se hizo una dilución 1:500 mezclando para ello, 1 $\mu$ L de plasma con 499  $\mu$ L de agua deionizada y se cuantificó la concentración de proteínas por medio del equipo Nanodrop.

Para obtener las muestras a la concentración necesaria, se calculó el volumen en el cual se cargan 30 $\mu$ g de proteínas en cada uno de los pozos de los geles de acrilamida. Cada muestra se preparó con Buffer de carga (LB) 5X \*(ver Anexo I), con la fracción de la muestra y agua bidestilada; las proteínas se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizarlas. Después, se separaron por electroforesis en una cámara BIORAD MiniProtean TretaSystem en los geles desnaturalizantes al 10% a 110 volts durante 150 minutos aproximadamente.

Las proteínas, ya separadas por peso molecular en el gel, fueron transferidas a membranas de polivinilfluoridona (PVDF) (Millipore) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara de transferencia semi húmeda (Bio-Rad, TransBlotsd, semi-dried). Posteriormente, las membranas fueron teñidas para una primera inspección con solución Rojo Ponceau \*(ver Anexo I), bloqueadas por 1 hora a temperatura

ambiente con una solución de bloqueo al 5% de leche descremada \*(ver Anexo I). Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario para SOD Cu/Zn.

Terminada la incubación primaria, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween \*(ver Anexo I) 3 veces por 5 minutos. Después, fueron incubadas durante 60 minutos con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (GE Healthcare, Piscataway, NJ) para determinar la presencia de las proteínas. Con este sistema, se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

## 6.6 Análisis espectrofotométrico.

### Actividad de la enzima superóxido dismutasa.

La actividad de la SOD se cuantificó usando el método de Oberley LW, 1984<sub>63</sub>.

Se realizó una inhibición competitiva usando la reducción de Nitrotetrazolio (NBT) por el sistema de xantina-xantina oxidasa. La mezcla de reacción contiene una concentración final de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.122 mM, NBT 30.6  $\mu$ M, xantina 0.122 mM, albumina de suero bovino 0.006%, y carbonato de sodio 49 mM. Se adicionaron 500  $\mu$ l del plasma fueron a 2.45 ml de la mezcla descrita antes, después 50 $\mu$ l de xantina oxidasa, con una concentración final de 2.8 unidades de actividad enzimática, la mezcla de reacción se incubó en baño a 27°C por 30 min. La reacción se detuvo con 1 ml de clorhidrocuprico 0.8 mM y la densidad óptica se leyó a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 530/UV visible. El 100% de la reducción de NBT se obtuvo mediante un blanco, tubo al cual se reemplazó la muestra por agua destilada.

Una unidad de SOD se expresa como aquella cantidad que inhibe en un 50% la reducción de NBT. Para determinar la actividad de la SOD-

Mn, la muestra se incuba durante 30 minutos con una solución de DDC (dopadecarboxilasa) con la finalidad de inhibir a la SOD-Cu Zn; la actividad de esta última se obtiene restando la actividad de la SOD total. Los resultados se expresan en U/mg proteína.

## 6.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del conteo celular fueron analizados con la prueba de Kruskal- Wallis y con una prueba de U de Mann-Whitney, se utilizó el programa PAST 1.75b y el programa Prism 4.00 (Graph pad, CA). Para todas las pruebas estadísticas se consideró una significancia de  $p < 0.05$ .

## 7. Resultados.

### Tinción de Wright.

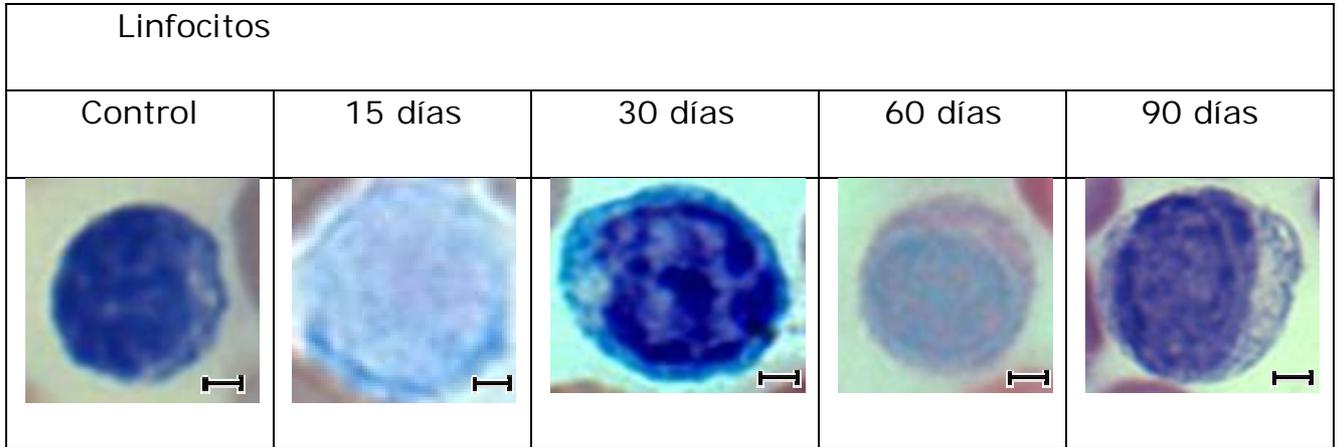
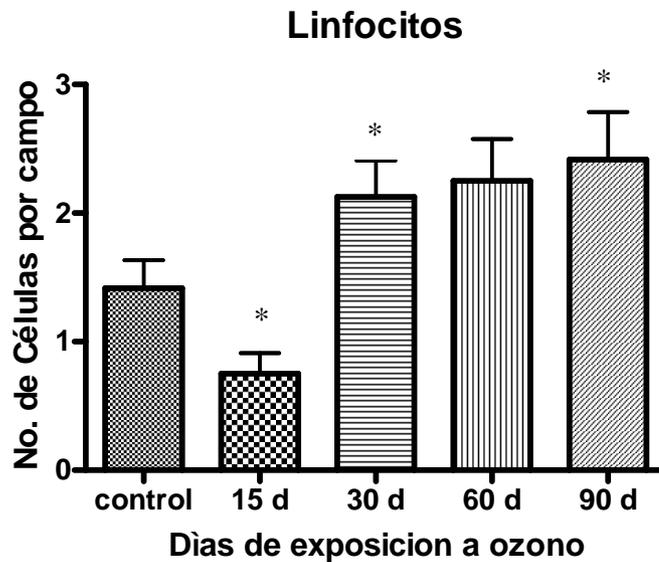


Figura 17. Fotomicrografías de linfocitos en frotis de sangre periférica de ratas expuestas a diferentes tratamientos de ozono. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x; se pueden observar cambios morfológicos en los núcleos, así como aumento del volumen de la célula.  = 50 micras.



Gráfica 1. Efectos del ozono en sangre de ratas. La ordenada representa el número de células por campo. Los tratamientos son indicados debajo de cada barra, \* diferencia significativa con respecto al control (con una  $p \leq 0.05$ ).

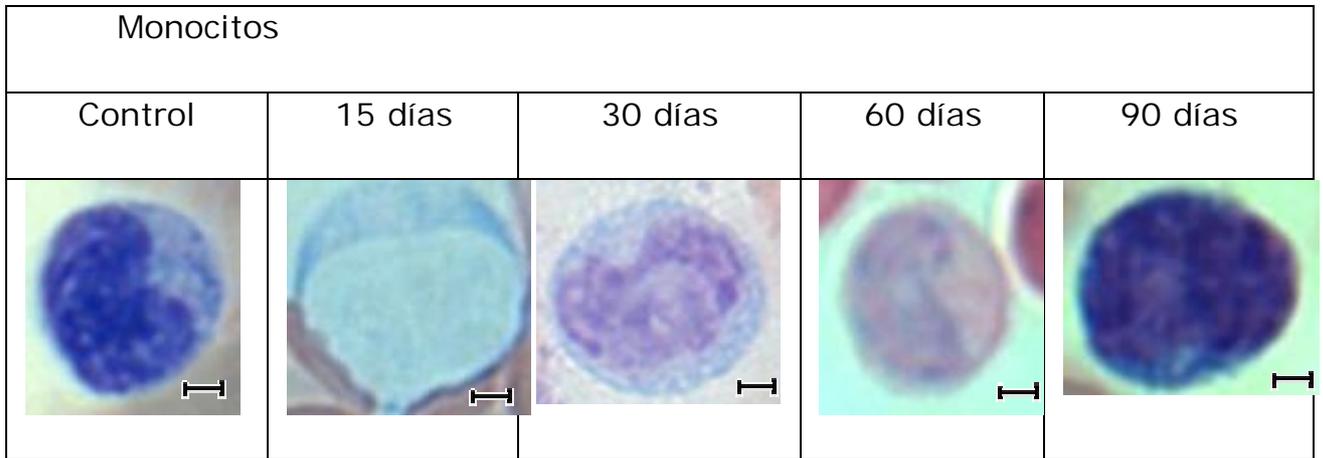
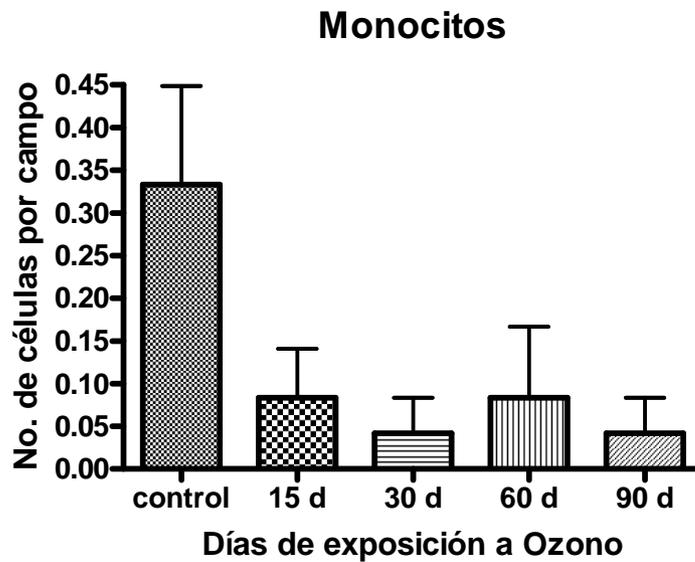


Figura 18. Fotomicrografías de monocitos en frotis de sangre periférica de ratas expuestas a diferentes tratamientos de ozono. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x; nótese el aumento de tamaño y cambios morfológicos nucleares, debido a los diferentes tratamientos. =50 micras.



Grafica 2. Efectos del ozono en sangre de ratas. La ordenada representa el número de células por campo. Los tratamientos son indicados debajo de cada barra, no existió diferencia significativa con respecto al control.

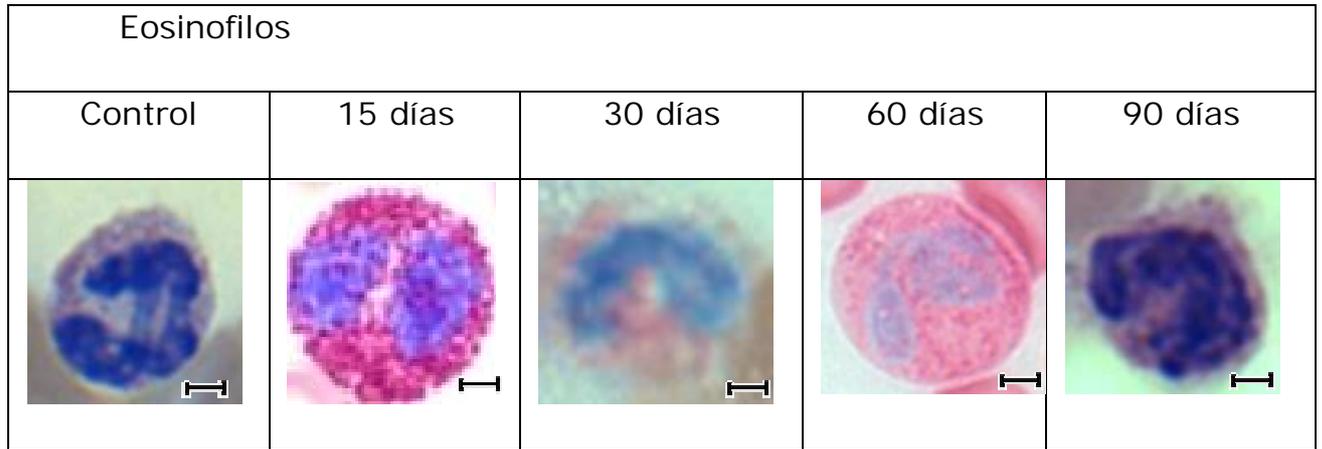


Figura 19. Fotomicrografías de eosinófilos en frotis de sangre periférica de ratas expuestas a diferentes tratamientos de ozono. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x; se observa el aumento en el volumen de las células, y diferencias morfológicas en los núcleos y en el citoplasma. ─ 50 micras.

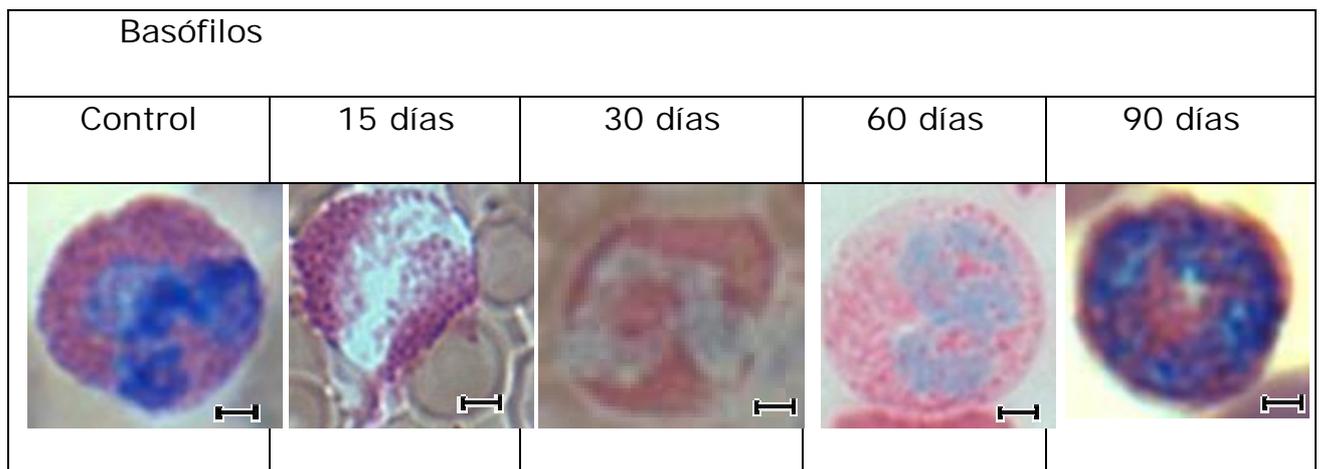


Figura 20. Fotomicrografías de basófilos en frotis de sangre periférica de ratas expuestas a diferentes tratamientos de ozono. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x. ─=50 micras.

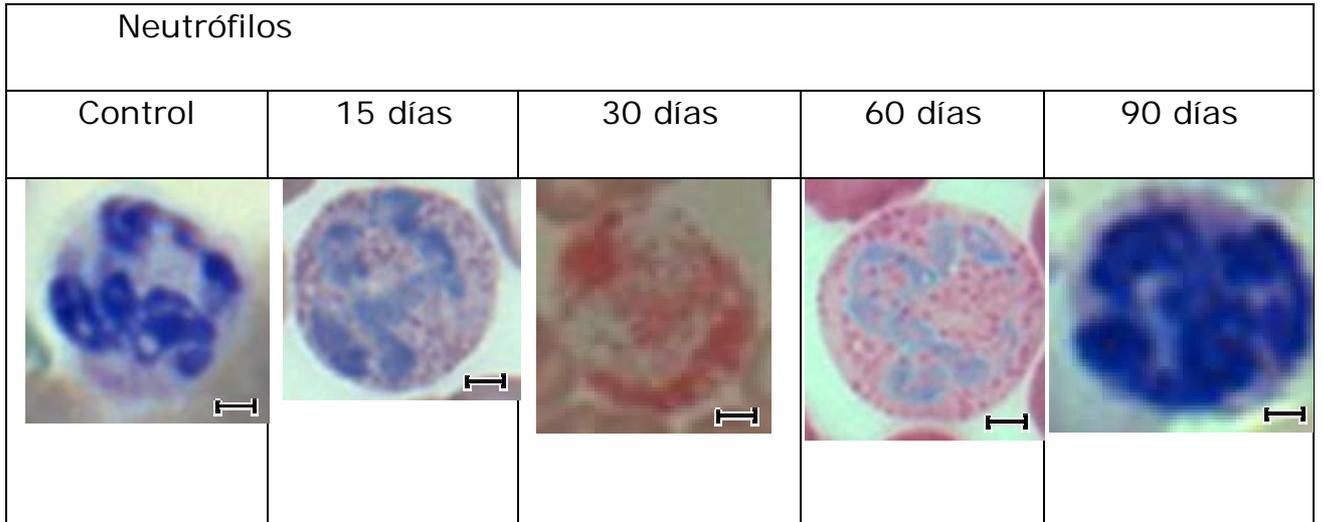
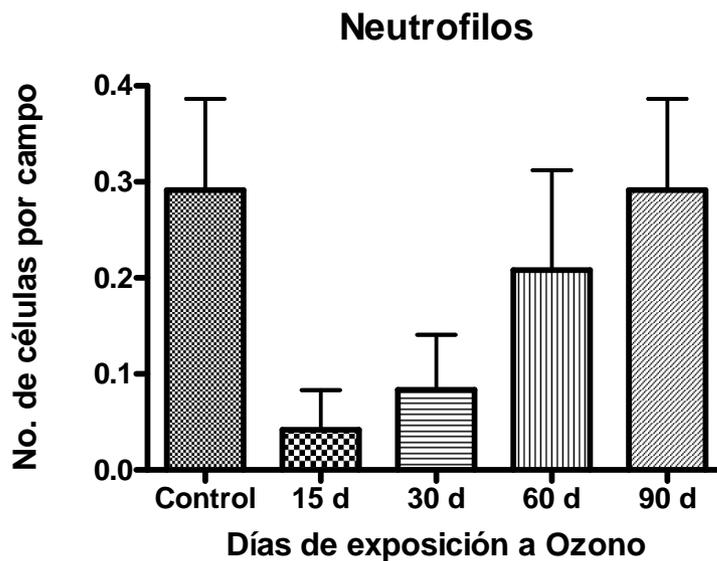
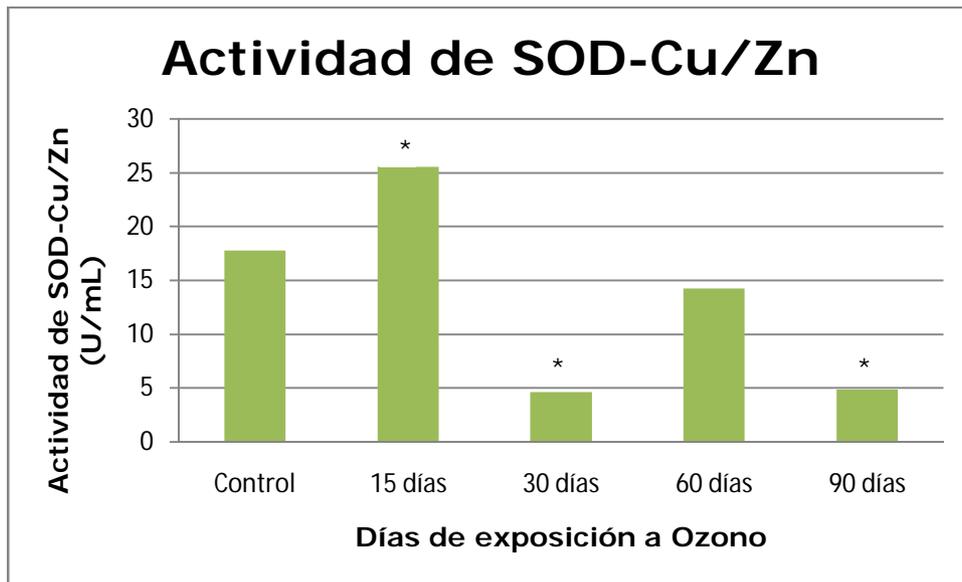


Figura 21. Fotomicrografías de neutrófilos en frotis de sangre periférica de ratas expuestas a diferentes tratamientos de ozono. Tinción por el método de Wright. Aumento 40x; nótese el aumento de tamaño y cambios morfológicos nucleares, debido a los diferentes tratamientos. ─=50 micras.



Grafica 3. Efectos del ozono en sangre de ratas. La ordenada representa el número de células por campo. Los tratamientos son indicados debajo de cada barra, no existió diferencia significativa con respecto al control.



Gráfica 4. Efecto del ozono en sangre de ratas. La ordenada representa la actividad protectora que provee la enzima SOD-Cu/Zn (U/mL). Los tratamientos son indicados debajo de cada barra, \* diferencia significativa con respecto al control (con una  $p < 0.05$ ).

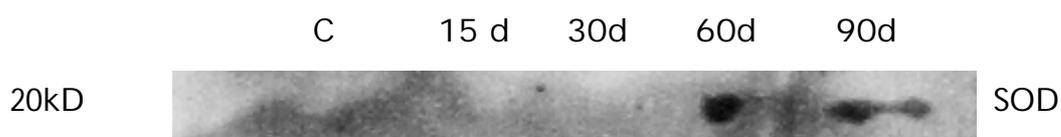


Figura 22. Expresión de la enzima SOD-Cu/Zn en plasma a los distintos tiempos de exposición a ozono, se observa que la cantidad de la enzima presente en el plasma es mayor a los 90 días que en el control.

## 8. Discusión de resultados.

El estrés oxidativo se produce por la exposición de los organismos a diversos factores (endógenos o exógenos) que incrementan la producción de las especies reactivas, lo que genera una ruptura del equilibrio redox, esta pérdida del equilibrio, implica también, un déficit en la producción endógena de defensas antioxidantes, las cuales no pueden compensar el incremento exagerado de la producción de especies reactivas. Todo esto trae como consecuencia un estado de estrés oxidativo, el cual causa daño y muerte celular, el estado de estrés oxidativo está asociado con la fisiopatología de las enfermedades crónico-degenerativas<sup>59</sup>, involucra la pérdida de la regulación de diferentes vías intracelulares llevando a la alteración de la homeostasis y a la pérdida de sus funciones fisiológicas<sup>60</sup>.

Las señales oxidativas regulan muchas vías celulares, como las metabólicas e inmunitarias<sup>61</sup>, y con base en los resultados obtenidos de la identificación y el conteo celular, observamos un aumento en la población celular de linfocitos a partir de los 30 días de exposición a ozono, es conocido que esta población celular reacciona ante un estado de estrés oxidativo producido por la exposición crónica a bajas dosis de ozono, puesto que los linfocitos participan tanto en la inmunidad humoral como de la celular, entonces es probable que los cambios encontrados sean un mecanismo mediante el cual estas

células modifiquen su respuesta ante un estrés oxidativo crónico, pues como se puede observar existe un decremento en la población a los 15 días de exposición al tratamiento seguido de un aumento a partir de los 30 días continuando así hasta los 90 días, es importante mencionar que en experimentos realizados en nuestro laboratorio y los cuales aún no han sido publicados sabemos que en este lapso de tiempo (15 días de exposición), el daño causado por el estrés oxidativo aún puede ser reversible, por lo que a partir de los 30 y hasta los 90 días se ve un aumento en esta población celular aunado a que es posible que debido al tratamiento, los macrófagos ya hayan excretado factores de activación de linfocitos.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran un decremento en el número de monocitos lo que permite suponer que esta población celular esta transformarse en macrófagos. Es importante recordar que este cambio puede ser producido por agentes externos al sistema inmune, en este caso son los radicales libres y las especies reactivas, (ver figura 18, gráfica 2) sin embargo, para poder comprobar que los monocitos conforme pasa el tiempo de exposición a bajas dosis de ozono se transforman en macrófagos, es necesario utilizar otra técnica que permita utilizar anticuerpos específicos para marcar a los monocitos activados en los tejidos.

Como se sabe los eritrocitos poseen una gran capacidad protectora debida a la enzima súperoxido-dismutasa de Cu/Zn la cual se encuentra en el citoplasma de los mismos, esta enzima es esencial para el desarrollo de la resistencia celular a la toxicidad inducida por las especies reactivas de oxígeno<sup>44</sup>, y es por eso que se hizo la cuantificación de la actividad de esta isoforma mediante la técnica de espectrofotometría.

Y al observar los datos obtenidos la actividad de la enzima SOD Cu/Zn vemos un incremento en los primeros 15 días de exposición a ozono debido a que se desencadena la reacción protectora y reversible del daño causado por la exposición crónica a bajas dosis de ozono que conducen al estrés oxidativo, cabe mencionar que la SOD es la primera línea de defensa, ya que cataliza la reacción de destrucción de los radicales superoxido mediante su transformación a peróxido de hidrógeno<sup>19</sup>.

Es de hacer notar que durante los primeros días de exposición se verán incrementados todos los sistemas: oxidantes, protectores y destructores de especies reactivas y radicales libres, por lo que en la gráfica 4 se observa un gran aumento de la actividad de la enzima SOD, es importante mencionar que al comparar los datos de la espectrofotometría contra los datos obtenidos en el Western Blot se puede apreciar que existe una gran actividad "protectora" de SOD

(aumento significativo con una  $p < 0.05$  para los primeros 15 días de exposición) aunque no exista gran cantidad de esta enzima en plasma, y para los últimos meses se observa en el western blot una gran expresión de la enzima pero una disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control de la capacidad protectora de la enzima SOD Cu/Zn, lo que hace evidente la necesidad del organismo por contrarrestar el daño causado por los radicales libres, sin embargo, la calidad o la capacidad protectora de la enzima SOD Cu/Zn se ve afectada por el continuo ataque de los radicales libres ya que las células sanguíneas al estar en exposición continua a ozono cursando así por un estado de estrés oxidativo, no pueden ni cuentan ya con la habilidad o facultad adecuada para contrarrestar dicho ataque mediante el sistema antioxidante endógeno, y es por eso que, se ve un cambio en la morfología en el núcleo de las células sanguíneas identificadas, es decir, se ve el aumento de tamaño y en la mayoría de los núcleos, se ve la turgencia producida por la pérdida de la homeostasis celular debida a las altas dosis o a la elevación inadecuada de las especies reactivas de oxígeno y a la producción de radicales de oxígeno, perdiendo así la actividad enzimática dando como resultado la pérdida de la integridad del citoesqueleto, lo que provoca edema celular y que además basándonos en resultados de experimentos realizados en nuestro laboratorio, el estado de estrés oxidativo influye sobre la permeabilidad de la membrana por la entrada de sodio, derivando así en un proceso de inflamación.

## 9. Conclusiones.

- Con los resultados obtenidos podemos concluir que el estado de estrés oxidativo producido por la exposición crónica a bajas dosis de ozono provoca un aumento en la población celular de linfocitos.
- Los resultados muestran una disminución de la actividad protectora de la SOD Cu/Zn en sangre periférica de ratas expuestas crónicamente a bajas dosis de ozono después de los 15 días de exposición.

## 10. Anexo I

### ❖ BUFFER DE TBS 10X, pH 7.5

Tris-Base                    60.5g

NaCl                         87.6g

Se pone en agitación con agua destilada y se ajusta el pH con HCl Se afora a 1lt

### ❖ BUFFER DE CORRIDA 10X

Tris-Base                    29g

Glicina                      144g

SDS                         10g

Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1lt.

### ❖ TBS TWEEN (TTBS)

TBS 1X                      1000ml

TWEEN 20                    1ml

### ❖ BUFFER DE CARGA 5X (LB5X)

SDS                         20g

Glicerol                    100 ml

Dithiothreitol(DTT)       15.4g

Tris 0.5M pH 8.5            26 ml

Azul Bromofenol            0.1g

Poner en agitación y aforar con agua destilada a 200 ml.

### ❖ BUFFER TRANSFERENCIA 10X

Tris-Base                    29g

Glicina                      144g

### ❖ BUFFER DE TBS 1X, pH 7.5

Se toman 100 ml de TBS 10X, pH 7.5 y se afora a 1lt. con agua destilada.

### ❖ BUFFER DE CORRIDA 1X

Se toman 100ml de Buffer de Corrida 10X y se afora a 1 lt. con agua destilada

### ❖ SOLUCION DE BLOQUEO

Para dos membranas. 2.5g de leche descremada en polvo en 50 ml de TTBS 1X

### ❖ BUFFER LISIS PROTEÍNAS (PIK)

NaCl                         1.75g

Tris HCl                    0.485g

EDTA stock 0,5M            2 ml

Se ajusta el pH a 7.4

Glicerol 10%                20 ml

NP 40 1%                    2 ml

Se afora a 200ml con agua desionizada  
Los inhibidores de proteasas Leupeptina, Pepstatina, Aprotinina se utilizan en proporción 1:1000 con el Buffer de Lisis de Proteínas

### ❖ BUFFER TRANSFERENCIA 1X

Se toman 100ml de Buffer de Transferencia 10X y se afora a 1 lt. con agua destilada

SDS 2g  
Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1lt.

❖ **SOLUCIÓN ROJO PONCEAU**

Ácido Acético concentrado 5ml  
Agua destilada 95ml  
Rojo Ponceau 0.1g

❖ **PERSULFATO DE AMONIO**

Persulfato de Amonio (APS) 0.1g  
Agua destilada 1ml

❖ **GEL DE POLIACRILAMIDA**

El gel tiene dos partes: Stacking (concentrante) y Resolving (separador)

**RESOLVING** (100ml) dependiendo el tamaño de las proteínas

Tamaño de la proteína (Kda)	14	15-70	20-100	50-250	>250
<b>% Gel</b>	14%	12%	10%	8%	7%
Glicerol 50%	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml
H <sub>2</sub> O	8.33ml	15ml	21.68ml	28.33ml	31.66ml
Tris 1,5M pH 8,8	25ml	25ml	25ml	25ml	25ml
Bisacrilamida 30%	46.66ml	40ml	33.32ml	26.66ml	23.33ml
SDS 10%	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

**STACKING** (100 ml)

H<sub>2</sub>O 61ml  
Tris 0,5M pH 6,8 25ml  
Disacrilamida 30% 13ml  
SDS 10% 1ml

**RESOLVING** (para dos geles)

Resolving 15 ml  
APS 150 µl  
TEMED 15 µl

**STACKING** (para dos geles)

Resolving 7 ml  
APS 90 µl  
TEMED 9 µl

**Abreviaturas:**

TBS: buffer salino de 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol.

NaCl: Cloruro de sodio.

pH: Potencial de hidrogeno.

SDS: sodio dodecyl sulfato.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

NP 40: Solución detergente.

TEMED: Tetrametiletildiamino.

## 11. Bibliografía.

1. Witmer, C. M. S.; Jollow, D. J.; Kalf, O. F.; Kocis, J. J. y Sipes, I. G. (1991). *Biological Reactive Intermediates IV*. New York, Plenum Press, pp. 417–428.
2. Behar, D.; Czapski, G.; Rabami, J.; Dorfman, I. M. y Schwarz, H. A. (1979). *The acid dissociation constant and decay kinetics of parthydroxyl radical*. *J. Phys. Chem.* Vol. 72(17): 3209-3213.
3. Korycka-Dahi, M. y Richardson, T. (1980). *Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk*. *J. Dairy. Sci.* Vol. 63 (7), 1181-1198.
4. Sáez, G.; Tornalley, P. J.; Hill, H. A. O.; Hems, R. y Bannister, J. V. (1982). *The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated hepatocytes*. *Biochem. Biophys. Acta* 719(1): 24-31
5. Viña, J.; Romero, F. J.; Sáez, G. T. y Pallardó, F. V. (1983). *Effect of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats*. *Experientia* 39(2): 164-165.
6. Barton, J. P. y Packer, J. E. (1970). *The radiolysis of oxygenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O<sub>2</sub>*. *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* 2(3): 159-166.
7. Boveris, A.; Oshino, N. y Chance, B. (1972). *The cellular production of hydrogen peroxyde*. *Biochem. J.* 128(3): 617-630.

8. Fridovich, I. (1976). Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxigen Toxicity. In: Free Radicals and Biology. Edited by Pryor W.A. Academic Press, New York, pp 239-277.
9. Janolino, V. G. y Swaisgood, H. E. (1975). *Isolation and characterization of sulphydryl oxidase from bovine milk*. J. Biol. Chem. 250(7): 2532-2538.
10. Romero-Alvira, D.; Calvo Rebollar, M.; Villalba Martín, M. P.; Amiguet García, J. A. y Bueno Gómez, J. (1988). *Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, Biología e implicaciones en patología médica I*. An.Med. Intern. 5(3): 146-151.
11. Korycka-Dahi, M. y Richardson, T. (1980). *Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk*. J. Dairy. Sci. 63(7): 1181-1198.
12. Liochev, S. I. y Fridovich, I. (1994). *The role of  $O_2^-$  in the production of HO: in vitro and in vivo*. Free Radical Biol. Med. 16(1): 29-33.
13. Aurand, L. W.; Boone, N. H. y Giddings, G. G. (1977). *Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation*. J. Dairy Sci. 60(3): 363-369.
14. Bredt, D. S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lownstein, C.; Reed, R. R. y Synder, S.H. (1991). *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase*. Nature 351: 714-718.

15. Lamas, S.; Marsden, P. A.; Li, G. K.; Tempst, P. y Michel, T. (1992). *Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform*. Proc. Natl. Acad. Sci. 89(14): 6348-6352.
16. MacMicking, J.; Xie, Q. W. y Nathan, C. (1997). *Nitric oxide and macrophage function*. Annu. Rev. Immunol. 15: 323-350.
17. Grisham, M. B.; Jourdain, D. y Wink, D. A. (1999). *Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*. Am. J. Physiol. 276 (2 Pt 1): G315-G321.
18. Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M. J. y Moncada, S. (1986). *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor*. Nature 320(6061): 454-456.
19. Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Winks, D. A. y Grisham, M. B. (1996). *Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide*. J. Biol. Chem. 271(1): 40-47.
20. Beckman, J. S. y Koppenol, W. H. (1996). *Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly*. Am. J. Physiol. 271(5 Pt 1): C1424-C1437.
21. Beckman, J. S.; Ye, Y. Z.; Anderson, P.; Chen, J.; Accavetti, M. A.; Tarpey, M.M. y White, C. r. (1994). *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry*. Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 375(2): 81-88.

22. Jourdañheuil, D.; Jourdañheuil, F. L.; Kutchukian, P. S.; Musah, R. A.; Wink, D.A. y Grisham, M. B. (2001). *Reaction of Superoxide and Nitric Oxide with Peroxynitrite*. J. Biol. Chem. 3;276(31): 28799-28805.
23. Lymar, S. V. y Hurst, J. K. (1995). *Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants*. Chem Res Toxicol. 1995; 8(6):833-840.
24. Goldstein, S. y Czapski, G. (2000). *Reactivity of peroxynitrite versus simultaneous generation of (\*)NO an O(2)(\*)(-) toward NADH*. Chem. Res. Toxicol. 13(8): 736-741.
25. Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J. y Merényi, G. (2000). *Tyrosin nitration by simultaneous generation of NO· and O<sub>2</sub>· - under physiological conditions. How the radicals do the job*. J. Biol. Chem. 275: 3031-3036.
26. Granger, D. N. y Kubes, P. (1996). *Nitric oxide as anti-inflammatory agent*. Methods Enzymol. 269: 434-442.
27. Wink, D. A. y Mitchel, J. B. (1998). *The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide*. Free Radical Biol. Med. 25(4-5): 434-456.
28. Freeman, B. A. y Crapo, J. (1982). *Free radicals and tissue injury*. Lab. Invest. 47(5):412-426.
29. Deno, P. C. y I.H., G. (1982). *Free radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bristanded DNA lesions*

- by the antitumor antibiotics bleomycin. *Chem. Res. Toxicol* 5(3): 311-332.
30. Doroshow, J. y Hochstein, P. (1982). Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. In: *Pathology of Oxygen*. ed., Academic Press, New York, pp. 245-253.
31. Bielsky, B. H. y Gebieki, J. M. (1977). Application of radiation chemistry to biology. In: *Free radicals in biology*. Edited by Pryor W.A., Academic Press, New York, pp. 1-51.
32. Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. In: *Free radicals biology*. Edited by Pryor W.A., Academic Press, New York, pp. 262-165.
33. Baccarini, D. P. (1978). *Coupled oxidation of NADPH wigythiols at neutral pH*. *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 315-357.
34. Massey, V.; Shopfer, L. M.; Nishino, T. y Nishino, T. (1989). *Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes*. *J. Biol. Chem.* 264(18): 10567-10573.
35. Boveris, A. y Chance, B. (1973). *The mitochondrial generation of hydrogenperoxide*. *Biochem J.* 134(3): 707-716.
36. Turrens, J. F. y Boveris, A. (1980). *Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. *Biochem. J.* 191(2): 421-424.

37. Nohl, H. y Jordan, W. (1986). *The mitochondrial site of superoxide formation*. Biochem. Biophys. Res. Commun; 138(2):533-539.
38. Capdevila, L.; Parkhill, L.; Chacos, N.; Okita, R.; Masters, B. B. S. y Estabrook, R. W. (1981). *The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 1357-1362.
39. Chignell, C. F. (1979). Spin labelling in pharmacology. In: *Espin labeling*. Edited by Pryor W.A., Academic Press, New York, pp. 223-228.
40. Dolphin, D. (1987). The generation of free radicals during de normal and abnormal functioning of cytochromes P450. In: *Oxygen radicals in biology and medicine*. Simic, M. G. T., Ward, F. F., Sonntag, C. Plenum Press, New York pp. 491-500.
41. Foster, R. R. y Estabrook, R. W. (1993). *Is oxygen an essential nutrient?* Annu. Rev. Nutr. 13: 383-403.
42. Frei, B. (1994). *Reactive oxygen species an antioxidant vitamins: Mechanisms of action*. Am. J. Med. 97(3A): 5S-13S.
43. Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Fourth Edition, Clarendon Press. Oxford, pp 527.
44. Ohno, H.; et al (1994). *Exercise and Oxygen Toxicity*. Amsterdam, Elsevier Publishers, vol.13, pp. 467-471.

45. Avissar, N.; Slemmon, J.; Palmer, I. (1992) Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. *J. Nutr.*; 12 (6): 1243–1249.
46. Stepanik, T y Ewing, D. (1993) Isolation of Glutathione peroxidase, Catalase and Superoxide dismutase of human erythrocytes. *J. Biochem., Biophysics.*; 20(2):157–169.
47. Maiorino, M.; Chu, F. y Ursoni; F. (1991). GPx-PH is the 18 KDa Selenio proteins expressed in human tumor cell lines. *J. Biol. Chem.*; 266 (12): 7728–32.
48. Chao, JC.; Yuen, MD.; Chen, PY y Chien, SW (2002). Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *J Nutr. Biochem*; 13(11): 653-663.
49. Mayes PA. (1997). Estructura y función de vitaminas liposolubles. En: *Bioquímica de Harper*. Murray RK, Mayes PA, Granner DK (eds). El Manual Moderno, S. A.; México D.F.; p.728-31
50. Neuzil, J.; Weber, C. y Kontush A. (2001). The role of vitamin E in Atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease. *Atherosclerosis*; 157(2):257-83.
51. Hoenjet, KMJ.; Dagneli, PC.; Delaere, KP.; Wijckmans, NE.; Zambon, JV. y Oosterhof Go (2005). Effect of a nutritional supplement containing vitamin E, Selenium, vitamin C and Coenzyme Q10 on serum PSA in patients with hormonally untreated carcinoma of the Prostate. *European Urology*; 47(4):433-439.

52. Rayman, MP. (2000). The importance of selenium in human health. *Lancet*; 356(9225): 233-241.
53. Thomas, DR. (2004). Vitamins in health and aging. *Clin Geriatric Med*; 20(2):259-74.
54. Vivekananthan, DP.; Penn, MS.; Sapp, SK.; Hsu, A. y Topol EJ. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease. *Lancet*; 361(9374):2017-23.
55. Butterfield, DA.; Castegna, A.; Pocernick, CB.; Drake, J.; Scapagnini, G. y Calabrese V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Nutr Biochem*; 13(8):444-61.
56. Epperly, MW.; Osipor, AN.; Martín, I.; Kawai, KK.; Borisenko, GG.; Tyurina, YY.; Jefferson, M.; Bernarding, M.; Greenberger, JS. y Kagan VE. 2004. Ascorbate as a "redox sensor" and protector against irradiation-induced oxidative stress. *Int J. Radiat Oncol Biol Phys.*; 58(3):851-61.
57. Shite, J.; Qin, F.; Mao, W.; Kawai, H.; Stevens, SY. y Liang C. 2001. Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia – induced cardiomyopathy. *J. Am. College Cardiol*; 38(6):1734-40.
58. Ames, BN.; Shigenaga, MK. y Hagen, TM. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci*; 90(17): 7915–7922.
59. Rivas-Arancibia Selva, Guevara-Guzmán Rosalinda, López-Vidal Yolanda, Rodríguez-Martínez Erika, Zanardo-Gomes Margarete,

Angoa-Pérez Mariana and Rita Raisman-Vozari. 2010. Oxidative Stress Caused by Ozone Exposure Induces Loss of Brain Repair in the Hippocampus of Adult Rats, *Toxicol Sci.* 113(1):187-97

60.Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.; Mazur, M. y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 39(1):44-84.

61.Gartner, Leslie P.; Hiatt, James L. Texto atlas de histología. 3a.ed.-- México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana, c2007. Página 574.

62.Oberley LW. Spitz Dr. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105:457-464.