



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**ZARAGOZA**

**PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA AORTA TORÁCICA**

**EN EL SÍNDROME LOEYS DIETZ**

**Que para obtener el título de Biólogo**

**PRESENTA:**

**Jorge Antonio Díaz Galindo**

**Director**

**Dr. Israel Pérez Torres**

**Departamento de Patología  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"**

**Asesor interno:**

**Dra. Elia Roldán Reyes**

**Citogenética y Mutagénesis, UMIEZ-CII, FES-Z, UNAM**



**CIUDAD.DE.MÉXICO...Abril 2016**



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.

<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>Síndrome Loews-Dietz</b>	<b>12</b>
<b>Morfología de la aorta</b>	<b>13</b>
<b>Aneurisma aórtico torácico</b>	<b>14</b>
<b>Disfunción endotelial</b>	<b>15</b>
<b>Estrés Oxidante</b>	<b>16</b>
<b>Especies Reactivas de Oxígeno</b>	<b>16</b>
<b>Radicales Libres</b>	<b>17</b>
<b>Fuentes de Producción de Especies Reactivas de Oxígeno</b>	<b>18</b>
<b>Especies reactivas de nitrógeno</b>	<b>19</b>
<b>Sintasas de óxido nítrico</b>	<b>19</b>
<b>Papel Fisiológico de las Especies Reactivas de Oxígeno</b>	<b>20</b>
<b>Daño a Moléculas Biológicas</b>	<b>20</b>
<b>Lípidos</b>	<b>20</b>
<b>Proteínas</b>	<b>21</b>
<b>Ácido Desoxirribonucleico</b>	<b>21</b>
<b>Sistema antioxidante</b>	<b>21</b>
<b>Glutación</b>	<b>22</b>
<b>Enzimas antioxidantes</b>	<b>22</b>
<b>Superóxido dismutasa</b>	<b>22</b>
<b>Catalasa</b>	<b>23</b>
<b>Glutación peroxidasa</b>	<b>23</b>
<b>Glutación-S-transferasa</b>	<b>24</b>
<b>Glutación reductasa</b>	<b>24</b>
<b>Antecedentes de Estrés oxidante en Síndrome de Marfán</b>	<b>24</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>

<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>General</b>	<b>28</b>
<b>Particular</b>	<b>28</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS</b>	<b>29</b>
<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>Pacientes</b>	<b>29</b>
<b>Controles</b>	<b>29</b>
<b>Homogeneización de aorta.</b>	<b>29</b>
<b>Detección de las enzimas antioxidantes SOD Mn, SOD Cu-Zn y</b>	
<b>CAT en geles nativos de poliacrilamida</b>	<b>30</b>
<b>Actividad de la Glutación Peroxidasas</b>	<b>30</b>
<b>Glutación-S-transferasa</b>	<b>30</b>
<b>Glutación reductasa</b>	<b>31</b>
<b>Glutación reducido</b>	<b>31</b>
<b>Glutación oxidado</b>	<b>31</b>
<b>Determinación de eNOS por inmunotransferencia</b>	<b>31</b>
<b>Capacidad antioxidante total</b>	<b>32</b>
<b>Índice de lipoperoxidación</b>	<b>32</b>
<b>Histología</b>	<b>33</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b>	<b>35</b>

<b>SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ENZIMATICO</b>	<b>39</b>
<b>HISTOLOGÍA</b>	<b>41</b>
Tinción Hematoxilina-Eosina	41
Tinción Tricrómica Masson	43
Tinción Weigert	45
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>LIMITACIONES</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>53</b>

## **Abreviaturas.**

**·OH** Hidróxido

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** Oxígeno singulete

**4-HNE** 4-Hidroxinonenal

**AAA** Aneurisma de aorta abdominal

**AAT** Aneurisma aórtico torácico

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**BHT** Butil hidroxitolueno

**CAT** Catalasa

**EC-SOD** Superóxido dismutasa extracelular

**EDTA** Etilendinitrilotetracetato disódico

**eNOS** Sintasa de óxido nítrico endotelial

**EOx** Estrés oxidante

**ERN** Especies reactivas de nitrógeno

**ERO** Especies reactivas de oxígeno

**FAD** Flavín adenín dinucleótido

**FMN** Flavín mono nucleótido

**FRAP** Poder antioxidante de reducción férrica (siglas en inglés)

**GPx** Glutación peroxidasa

**GSH** Glutación

**GSSG** Disulfito de glutación

**GSSG-R** Glutación reductasa

**GST** Glutati3n-S-transferasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Per3xido de hidr3geno

**HO<sub>2</sub><sup>·</sup>** Hidroperoxilo

**iNOS** Sintasa de 3xido n3trico inducible

**LDS** S3ndrome Loeys Dietz (siglas en ingl3s)

**LPO** Peroxidaci3n lip3dica

**MDA** malondialdeh3do

**NADH** Nicotinamida adenina dinucle3tido

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato reducido

**NBT** Cloruro de nitroblue tetrazolium

**nNOS** Sintasa de 3xido n3trico neuronal

**NO** 3xido n3trico

**NO<sub>2</sub>** Di3xido n3trico

**O<sub>2</sub>** Ox3geno

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** Anion radical super3xido

**OCl<sup>-</sup>** Hipoclorito

**ONOO<sup>-</sup>** Peroxinitrito

**PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida (siglas en ingl3s)

**R-O<sub>2</sub>** Per3xilo

**R-OOH** Hidroper3xido

**RL** Radical libre

**RO<sup>·</sup>** Alcoxi

**SDS** Dodecilsulfato de sodio

**Se** Selenio

**SM** Síndrome Marfán

**SOD Cu-Zn** Superóxido dismutasa cobre-zinc

**SOD Mn** Superóxido dimutasa manganeso

**SOD** Superóxido dismutasa

**TBARS** Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico

**TEMED** N,N,N'N'-tetrametiletilendiamina

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante beta

**TGFBII** Factor de crecimiento transformante beta II

**TGFBRI** Factor de crecimiento transformante del receptor beta I

**TGFBRII** Factor de crecimiento transformante del receptor beta II

**TROLOX** Ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcroman-2-carboxílico

**Zn** Zinc

## **Dedicatoria.**

A mis padres y hermanos

Martha Galindo Ayala y Willevaldo Díaz Tecpa, Miguel Díaz Galindo y Jeovanni Díaz Galindo  
sin ustedes no habría podido llegar hasta aquí.

A Patricia Baeza Capetillo e Idalia Pérez Torres.

A Gabriela Ugalde Fuentes, por ser parte de esta travesía, a la ayuda, las palabras de aliento y  
estar ahí en los momentos difíciles

## **Agradecimientos**

Al Doctor Israel Pérez Torres por abrir las puertas de su laboratorio para poder llevar a cabo mi trabajo de tesis, a las enseñanzas, al tiempo invertido en mi persona y por todo lo aprendido.

A la Doctora María Elena Soto López por asesorarme y facilitarme las muestras de aorta de los pacientes con Loeys-Dietz y controles.

Al Doctor Alberto Aranda Fraustro por la ayuda en los métodos histológicos y en su interpretación.

A la Doctora Alejandra M. Zúñiga Muñoz por brindarme el apoyo y asesoramiento en el laboratorio... ¡gracias!

## RESUMEN

El síndrome Loeys-Dietz, presenta características que lo relacionan con el síndrome de Marfán. El síndrome Loeys-Dietz es causado por mutaciones en los genes que codifican al factor de crecimiento transformante beta-2, a sus receptores de tipo I, II y al SMAD3.

La característica de este síndrome es la presencia de aneurismas en 98% de los casos, estos presentan alto riesgo de disección ó rotura, siendo la principal causa de muerte. Por otra parte, la vía de señalización de SMAD3 está implicada en la formación de aneurismas por estrés oxidante.

En el síndrome de Marfán y algunas de sus variantes se ha descrito la participación del estrés oxidante en el desarrollo de aneurisma aórtico torácico. Sin embargo, en el síndrome Loeys-Dietz no hay nada descrito al respecto.

**Objetivo:** analizar algunas de las enzimas antioxidantes en la aorta torácica de pacientes con síndrome Loeys-Dietz.

**Material y metodos:** cinco pacientes con Loeys-Dietz (3 hombres y 2 mujeres) con edad mediana de 18 min-max (13-38 años) fueron evaluados por un reumatólogo y cumplían con el criterio según la clasificación de Ghent's y cinco sujetos (3 hombres y 2 mujeres) con mediana de edad 44 min-máx (58-72 años) sin enfermedad aortica fueron utilizados como controles. Los segmentos de aorta torácica de los Loeys-Dietz y control fueron obtenidos mediante cirugía de Bentall y Bono y por cambio valvular aórtico respectivamente. Las muestras de aorta se homogeneizaron con amortiguador de sacarosa pH 7.35. La actividad de las enzimas glutatión reductasa, glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa se analizaron por espectrofotometría. La actividad de catalasa, superóxido dismutasa cobre-zinc y manganeso se cuantificaron por geles nativos de poliacrilamida. La expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial fue determinada por inmunotransferencia y la lipoperoxidación, sistema antioxidante no enzimático, glutatión reducido y glutatión oxidado se analizaron por espectrofotometría. Los cambios estructurales de las aortas se valoraron mediante las tinciones histológicas de hematoxilina-eosina, Masson o Weigert.

**Resultados:** El sistema antioxidante no enzimático, las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa y la relación glutatión reducido/glutatión oxidado, presentaron disminución significativa en el grupo Loeys-Dietz en comparación con el grupo control.

Las enzimas superóxido dismutasa cobre-zinc, superóxido dismutasa manganeso y glutatión reductasa aumentaron significativamente en Loeys-Dietz en comparación con el control, en cuanto a la catalasa, y la sintasa de óxido nítrico endotelial mostrarón tendencia a disminuir sin alcanzar significancia en el grupo Loeys-Dietz en comparación con el grupo control, la lipoperoxidación tendió a incrementarse sin ser significativo en el grupo Loeys-Dietz en comparación con el grupo control. La histología de los aneurismas de los pacientes con Loeys-Dietz mostró necrosis quística, fragmentación y engrosamiento de las fibras elásticas en la túnica media, en comparación con el grupo control.

**Conclusiones:** En los pacientes con LDS, el daño estructural del aneurisma aórtico torácico ocasiona disfunción endotelial, que conduce al incremento en la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y -Mn. Esto aumenta la formación de ERO, las cuales no son eliminadas, ya que la actividad de la CAT y GPx están disminuidas, lo que favorece que el índice GSH/GSSG disminuya, limitando la actividad de la GPx y GST que utilizan al GSH como sustrato.

El incremento de la GSSG-R no restablece la concentración del GSH lo que se refleja en la disminución de la capacidad antioxidante total y el aumento de la LPO que favorece a las ERO

## INTRODUCCIÓN

Los pacientes marfanoides tienen semejanza clínica con los del síndrome de Marfán (SM) pero no tienen todos los criterios del diagnósticos. Entre las enfermedades con habito marfanoides encontramos el fenotipo MASS, (*mitral-valve-aorta-skeleton-skin*), homocistinuria, síndrome de Beals-Hecht, síndrome de Stickler, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Shprintzen-Goldberg, síndrome de Achard y síndrome Loeys-Dietz (LDS) (Aviña, 2011; Soto, 2014).

### Síndrome Loeys-Dietz

El LDS es descrito por primera vez en 2005 por Bart Loeys y Harry Dietz, (Wellbrock, 2014), es una enfermedad autosómica dominante debida a las mutaciones en los genes que codifican al factor de crecimiento transformante del receptor beta I (TGFB1 siglas en inglés) (Aalberts *et al.*, 2008; De León, 2008), ubicado en el cromosoma 9q22.33, al factor de crecimiento transformante beta del receptor tipo II (TGFB2, siglas en inglés) ubicado en el cromosoma 3p24.1, al SMAD3 (cromosoma 15q22.33) y al factor de crecimiento transformante, beta-2; (TGFB2 siglas en inglés) ubicado en el cromosoma 1q41 (MacCarrick et al. 2014).

El síndrome se caracteriza por facies inusuales, dolicocefalia, craneosinostosis, hipertelorismo, hipoplasia malar, paladar arqueado, úvula ancha o bífida, retrognatia, deformidad del esternón, que puede ser *excavatum* o *carinatum*, escoliosis, laxitud articular, ectasia dural, dedos largos pero sin sobre crecimiento óseo, contracturas, pie equino, piel translúcida, problemas de aprendizaje (Aviña, 2011), complicaciones durante el embarazo, tal como la ruptura uterina y muerte (Soto *et al.*, 2014). Los pacientes con LDS tienen una fuerte predisposición a la tortuosidad arterial (Maleszewski, 2009), además los aneurismas de aorta son muy frecuentes, apareciendo en el 98% de los casos a edad temprana, se caracterizan por alto riesgo de disección ó rotura, incluso con diámetros menores a 5 cm. Hasta el 53% de los pacientes desarrollan aneurismas en otras localizaciones (Ramírez, 2012), otros hallazgos cardiovasculares recurrentes incluyen al conducto arterioso persistente, defectos del tabique ventricular y la válvula aórtica bicúspide. Aunque todos estos hallazgos pueden presentarse en la población general, la incidencia en LDS excede por lo menos cinco veces la observada (Loeys, 2008).

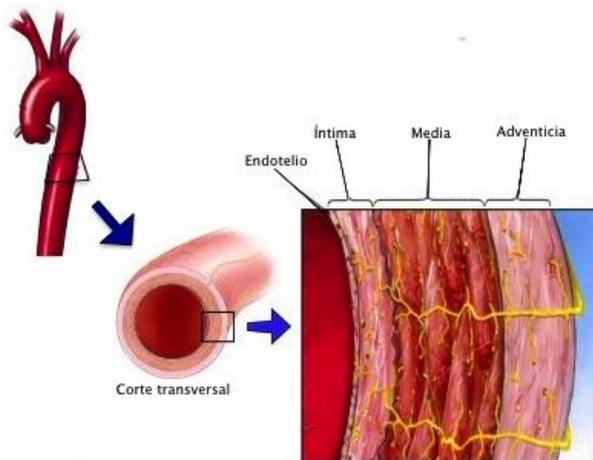
En la primera descripción de LDS, se hicieron hallazgos histológicos similares a los observados en aortas de pacientes con SM, tanto en la pérdida de contenido y desorden de fibras elásticas, como en el aumento de la deposición de colágeno, sin embargo en descripciones más recientes los LDS presentan un grado mayor en los parámetros antes mencionados (Loeys *et al.*, 2005).

### **Morfología de la aorta**

De acuerdo con las diferencias funcionales, grosor y las características de la túnica media, las arterias pueden clasificarse en tres grandes grupos:

Las arterias elásticas; son de conducción, tienen el mayor grosor y están cercanas al corazón. Las arterias musculares, se encargan de la distribución y por último las arteriolas (Welsch, 2006). Las arterias elásticas son: la aorta, el tronco pulmonar, carótida, subclavia y coronarias (Kassck, 2003), las cuales poseen láminas fenestradas en su pared, el tejido de las arterias se nutre desde la luz por pequeños vasos que entran en la pared, estos últimos irrigan por lo menos la mitad externa de la pared arterial (Welsch, 2006).

La pared de las arterias y venas está constituida por tres capas concéntricas llamadas túnicas: íntima, media y adventicia, (Fortoul y Castell, 2010). La figura 1 muestra las diferentes capas de la aorta.



**Figura 1.** Corte transversal de la aorta torácica.

La túnica íntima, está compuesta por el endotelio, la lámina basal y una capa delgada de tejido conjuntivo laxo, además de algunas células musculares lisas y fibras de colágena finas, así como algunas fibras elásticas con proporción elevada de microfibrillas. Con

frecuencia, la túnica íntima se altera a causa de procesos patológicos y puede contener macrófagos repletos de lípidos. Las células endoteliales están unidas por *zonulae occludentes* y nexos aislados, el remplazo de estas células ocurre con lentitud aproximadamente cada 30 años (Welsch, 2006).

La túnica media, está compuesta por láminas o membranas fenestradas de elastina entre las que se ubican células musculares lisas de disposición más o menos circular, fibrillas de colágena, proteoglicanos y células musculares lisas de curso longitudinal. El sistema de láminas elásticas es complejo, sus fenestraciones y poros son de diámetro variable y las láminas tienen formas diversas, están unidas por fibras elásticas finas, la cantidad de músculo liso es claramente menor que en las arterias de tipo muscular. Las células musculares lisas pueden estar ramificadas y se vinculan tanto con la colágena como con el sistema elástico, no sólo son elementos contráctiles sino que también producen elastina, colágena y proteoglicanos (Kassack, 2003; Welsch, 2006 ). Las alteraciones en la estructura de la túnica media pueden producir pérdida de la elasticidad vascular, factor fundamental en la patogenia del aneurisma (Kuzmik, 2012).

Por ultimo, la túnica adventicia es relativamente delgada y está compuesta por fibroblastos, fibras de colágena de trayecto principalmente longitudinal y una red laxa de fibras elásticas (Kassack, 2003; Welsch, 2006).

### **Aneurisma aórtico torácico**

Aunque la prevalencia del aneurisma aórtico torácico (AAT) es probablemente más baja que la del aneurisma de aorta abdominal (AAA), los AAT pueden contribuir como componente importante de la enfermedad vascular debido a su naturaleza particularmente letal (Kuzmik, 2012).

El impresionante descubrimiento de patrones familiares y nuevos loci genéticos para los AAT desafía la idea de que la mayoría sea simplemente esporádica. Aunque la aorta crece de forma indolente, su tasa de crecimiento y su diámetro tienen importantes implicaciones clínicas. Los estudios biomecánicos han apoyado hallazgos clínicos de 6,0 cm como umbral peligroso. Más del 95% de los casos son asintomáticos, es decir, la mayoría de los AAT no se detectan. La extirpación quirúrgica de los AAT es actualmente el pilar del tratamiento eficaz, la reparación endovascular es cada vez más común y la seguridad a largo plazo no se ha comprobado (Kuzmik, 2012).

Series clínicas recientes en los patrones mendelianos en familias de pacientes AAT han revelado que el 21% tienen al menos un miembro de la familia con aneurisma de algún tipo; muchos más miembros de la familia probablemente albergan aneurismas desconocidos no diagnosticados. De estas formas familiares, el 77% se hereda de forma autosómica dominante con expresividad variable (Ramirez, 2012).

Los AAT también pueden ocurrir como parte de síndromes genéticos complejos, incluyendo el SM (el más común), el síndrome de Ehlers-Danlos, LDS y el síndrome de Turner. El promedio de dilatación del aneurisma de aorta ascendente es de 0.10 cm por año, mientras que los AAT descendente crecen alrededor de 0.29 cm (Boileau, 2014).

Las aortas de pacientes con SM crecen a 0.1 cm / año, mientras que los AAT del síndrome LDS especialmente maligno puede crecer más de 1,0 cm / año, lo que les puede ocasionar la muerte. Se ha descrito que en el desarrollo de los AAT hay presencia de disfunción endotelial y disminución en la síntesis del óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) (Kuzmik, 2012).

### **Disfunción endotelial**

En el sistema vascular de los mamíferos, el endotelio es la única estructura anatómica que responde de forma directa a las fuerzas físicas del flujo sanguíneo. Entre las principales funciones del endotelio puede mencionarse su participación en el balance de mediadores inflamatorios y anti-inflamatorios, así como en la regulación del tono vascular. Uno de los principales factores para la pérdida de este equilibrio regulador es la alteración en la producción de NO que caracteriza la disfunción endotelial (Torres, 2009).

La producción basal de NO en la célula endotelial es principalmente a través de la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), la cual depende de gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, una vez activada, cataliza la oxidación enzimática del aminoácido *L*-arginina a *L*-citrulina, teniendo como subproducto de reacción al NO. En este proceso catalítico, participan cofactores como el NADPH y la tetrahidrobiopterina (Torres, 2009).

Cuando el sustrato de la síntesis de NO, es insuficiente, la transferencia de electrones se desvía al  $\text{O}_2$ , y se forman aniones superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), las cuales son altamente reactivas y dañan a la membrana celular (Meaney, 1999). Además el desacoplamiento de la eNOS, produce  $\text{O}_2^-$  y NO simultáneamente, bajo esta

circunstancia, la eNOS puede convertirse en generadora de peroxinitrito, (ONOO<sup>-</sup>) (Cai, 2000).

### **Estrés Oxidante**

Una vez superados los mecanismos antioxidantes del organismo, es imposible inactivar la reactividad química de las especies reactivas de oxígeno (ERO) presentándose el estado metabólico de estrés oxidante (EOx), el cual se define como el desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes. Con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de EOx puede dividirse en tres etapas o niveles de progresión o intensidad (adaptación, agudo y crónico), tomando en consideración las características del daño estructural y funcional ejercido como consecuencia de la reactividad de las diferentes ERO, así como el tiempo de exposición a las mismas y las evidencias de modificaciones en los procesos biológicos (Hicks, 2006).

El deterioro celular producido por el EOx es responsable de diversas enfermedades crónico degenerativas, como el Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington, lesión cerebral hipertensiva, distrofia muscular, esclerosis múltiple, cáncer, degeneración de la retina, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, diabetes, síndrome metabólico, anomalías cardiovasculares, hipertensión, trastornos nefrológicos, enfisema pulmonar, infarto, anemia, hepatitis, pancreatitis, envejecimiento prematuro, disfunción endotelial y dermatitis, entre otras (Martínez, 2005; Delgado, 2010; Pisoschi, 2015).

### **Especies Reactivas de Oxígeno**

Las ERO pueden oxidar de manera directa y dañar al ADN, proteínas, lípidos de membrana e inactivar a las enzimas antioxidantes, además de aumentar la expresión de genes proinflamatorios e inducir daño celular y apoptosis (Fletcher, 2015).

Si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee (Venero, 2002).

El término ERO se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes (Avello, 2006). Las ERO son moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno, englobando también a los radicales libres (RL) y a otras especies no radicales que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de agentes pro oxidantes, entre ellas se encuentran:

- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)

- Peróxido (R-OO)
- Semiquinona (Q)
- Hipoclorito (OCI-) (Venero, 2002; Chirino, 2006; Hernandez, 2009; Cai, 2010; Rahal, 2014).

### **Radicales Libres**

La mayor parte de los compuestos químicos de importancia biológica están formados por átomos unidos por enlaces covalentes, en estos enlaces dos átomos comparten un par de electrones en el último orbital molecular y cada electrón muestra rotación o giro opuesto a su par. En las células se llevan a cabo reacciones químicas que rompen estos enlaces de manera heterolítica, haciendo que una de las partes conserve dos electrones y la otra tenga deficiencia de dos electrones, lo cual genera compuestos estables nucleofílicos o electrofílicos respectivamente, que son los aniones y cationes. Sin embargo, algunas reacciones químicas, la radiación electromagnética y otros factores, pueden romper estos enlaces de forma homolítica, proceso después del cual cada parte conserva un solo electrón que estará desapareado, generándose así los RL (Quintanar, 2009).

En sentido estricto los RL representan cualquier especie química de existencia independiente que poseen un electrón desapareado, girando en su orbital atómico externo. Esta configuración electroquímicamente inestable, les confiere la propiedad de ser una especie química altamente agresiva y de vida corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman (Pérez, 2000; Chihuailaf, 2002; Venero, 2002).

Diversos autores han clasificado a los RL de acuerdo con el grupo funcional presente. El tipo más frecuente es el RL de oxígeno, en cuya estructura está presente como centro funcional. De menor preponderancia son los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo, otros RL descritos contienen nitrógeno, carbono, fósforo.

El grupo de RL de oxígeno está constituido por anión radical  $O_2^-$ ; hidróxido ( $\cdot OH$ ), radical hidropéroxido ( $HO_2\cdot$ ),  $RO_2\cdot$ , y radical alcoxi ( $RO\cdot$ ), especies radicales que son de interés biológico (Chihuailaf, 2002; Martínez, 2005). Estos radicales se generan en las células fundamentalmente por reacciones con transferencia de electrones, estos pueden ser mediados por la acción enzimática o producirse sin la intervención de enzimas, a menudo con la colaboración de iones metálicos de transición como hierro, cobre reducidos (reacciones de Fenton y Haber Weiss, respectivamente) (Martínez, 2005).

La vida media biológica de los RL es de microsegundos, a pesar de esto, pueden reaccionar rápidamente con todo lo que esté a su alrededor, provocando daño a macromoléculas y a estructuras celulares como las membranas. Los RL tienen diferente vida media, siendo siempre bajas pero suficientes para difundir y actuar en organelos o células vecinas (Quintanar, 2009).

### **Fuentes de Producción de Especies Reactivas de Oxígeno**

Estas especies se generan continuamente en las células aeróbicas a través de múltiples vías y procesos entre ellos están:

- **Mitocondria:** Durante el metabolismo aeróbico normal, las mitocondrias son importante fuente de ERO, consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua. Una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente y los inevitables productos intermedios de esta son;  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ , (Rahal, 2014) y a través del desacoplamiento o fuga de electrones provenientes de los complejos I y II mitocondriales de la cadena respiratoria (Hernández, 2009).
- **NAD(P)H oxidasas:** Neutrófilos, monocitos, macrófagos, fibroblastos de la túnica adventicia, células de músculo liso vascular y endoteliales contienen NADPH oxidasas asociadas a la membrana plasmática, estas enzimas utilizan NADH o NAD(P)H como donadores de electrones para generar  $O_2^-$  (Ceballos, 2006)
- **eNOS:** Es un homodímero, cada monómero está constituido por un dominio de reductasa (con sitios de enlace para NADPH, FAD Y FMN,) y por un dominio oxigenasa (conteniendo Zn, tetrahidrobiopterina, hemo y L-arginina) que están unidas por una región a la que se enlaza la tetrahidrobiotrina, la eNOS puede desacoplarse y reducir  $O_2$  en lugar de transferir electrones a la arginina, generando  $O_2^-$  (Ceballos, 2006), esta enzima tiene un papel dominante en las enfermedades cardiovasculares (Yang, 2010).
- **Peroxisomas:** Contienen acil-coA oxidasa, dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, urato oxidasa y otras, generan  $H_2O_2$  como producto intermedio.
- **El citocromo P-450:** Constituye una defensa primaria contra varios xenobióticos y sustancias endógenas que aumentan la producción de RL (Rahal, 2014).
- **Xenobióticos:** el paracetamol, el tetracloruro de carbono, la furosemida, el humo de cigarrillos y la radiación solar, producen RL (Venero, 2002).

- Metales de transición: El  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  son catalizadores fuertes para reacciones de oxidación en la presencia de hidroperóxidos.
- Otros oxidantes: A los radicales lipoperóxido se les propone como los principales mediadores de la peroxidación lipídica (Ceballos, 2006).

### **Especies reactivas de nitrógeno**

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) se producen principalmente en reacciones metabólicas en el citosol, especialmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y como producto de la acción de la familia de las sintasas del óxido nítrico.

Las ERN, fueron inicialmente descritas como responsables del proceso de contracción de las células del músculo liso en los vasos sanguíneos y actualmente han sido involucradas en los procesos de regulación del metabolismo de las neuronas (Gutiérrez, 2006).

Entre las ERN se encuentran; el NO y el dióxido nítrico ( $\text{NO}_2$ ). El NO radical de importancia fisiológica esencial en funciones biológicas complejas como la neurotransmisión y neuroregulación del sistema nervioso, así como en procesos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, con el oxígeno genera  $\text{NO}_2$  y con el  $\text{O}_2$  forma  $\text{ONOO}^-$  (Quintanar, 2009), el cual puede oxidar diversas moléculas. El  $\text{ONOO}^-$  puede descomponerse en radicales  $\cdot\text{OH}$  independientemente de la presencia de metales de transición. La forma protonada del peroxinitrito ( $\text{ONOOH}$ ) es un fuerte agente oxidante, el cual consume a los grupos sulfhidrilos, ocasiona daño oxidativo en varias biomoléculas, actuando de forma similar al  $\cdot\text{OH}$ . También es responsable de rupturas de ADN, oxidación de proteínas y nitración de aminoácidos aromáticos (Pisoschi, 2015).

### **Sintasas de óxido nítrico**

La familia de las sintasas de NO está formada por tres isoformas; Neuronal (nNOS), NOS inducible (iNOS) y NOS endotelial (eNOS). El gen *NOS1* codifica a la nNOS, cuya importancia cardiovascular es menor, pues la enzima se produce en el músculo estriado pero no en los miocitos cardiovasculares. También se encuentra en las terminaciones nerviosas de las fibras colinérgicas y adrenérgicas, en epitelios y en el sistema de conducción cardíaco. Por su parte, el gen *NOS2* codifica la iNOS, se localiza en macrófagos, fibroblastos, endotelio, miocitos vasculares y cardíacos. Se le llama sintasa inducible porque solo se expresa en las células que han sido activadas previamente por diferentes citocinas (Meaney, 1999). La iNOS genera altos niveles de NO que promueven el Eox (Starke, 2013).

Finalmente el gen *NOS3* codifica a la eNOS, que es producida en el endotelio. A diferencia de la iNOS, la eNOS es expresada en forma constitutiva, es decir sin que las células que la producen tengan que ser activadas por citocinas. Por ello, la eNOS realiza las funciones normales del endotelio. Las ERO reaccionan con el NO, lo que tiene primordial importancia para comprender los procesos oxidativos que se lleva a cabo en la pared vascular y las acciones contra reguladoras de los antioxidantes (Meaney, 1999).

### **Papel Fisiológico de las Especies Reactivas de Oxígeno**

Ha sido descrito que en bajas concentraciones las ERO se relacionan con algunas respuestas celulares a agentes patógenos (bacterias, protozoos, virus), además de la función de numerosos sistemas de señalización celular así como respuesta mitogénica, síntesis de colágeno, síntesis de prostaglandinas, disminución de la síntesis de catecolaminas, modificaciones de las biomembranas y favorecen la quimiotaxis (Venero, 2002; Echeverri, 2010).

### **Daño a Moléculas Biológicas**

Por otra parte, las ERO a altas concentraciones ocasionan daño a los ácidos nucleicos, proteínas y a los fosfolípidos de la membrana celular. La interacción de las ERO con estas moléculas producirá en ellas modificación estructural, que se traducirá en alteración funcional de importancia biológica con consecuencias irremediables a corto, mediano o largo plazo (Paredes y Roca, 2002; Echeverri, 2010; Cruz, 2011).

### **Lípidos**

La peroxidación lipídica (LPO) es la oxidación en cadena de los lípidos poliinsaturados originada por RL, esta reacción forma un radical lipídico que después, puede reaccionar con el oxígeno para originar el R-OO. Este a su vez puede reaccionar con otros ácidos grasos de la membrana, formando otros radicales lipídicos, transformándose el mismo en hidroperóxido (R-OOH). El R-OOH, en presencia de varios complejos metálicos, se puede descomponer en más radicales, incluyendo entre ellos al  $\cdot\text{OH}$ , lo que provoca un fenómeno de expansión del daño y propagación de la peroxidación.

En ausencia de iones metálicos los R-OOH se pueden acumular en la membrana y con esto alterar su función. También se pueden transformar en hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos como el 4-hidroxinonal (4-HNE) y malondialdehído (MDA) entre otros (Chihuailaf, 2002), los cuales se difunden lejos del lugar donde se originaron, ocasionando daños a otras macromoléculas. Dentro del proceso de la LPO, los RL que se forman pueden causar también daño a las proteínas de la membrana celular (Quintanar,

2009).

### **Proteínas**

Las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las ERO, su acción es menos dramática en comparación de los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones. La acción de las ERO sobre las proteínas se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos de los aminoácidos y los grupos tiol. De esta forma, proteínas ricas en determinados aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. Los grupos sulfhidrilo pueden ser transformados en puentes disulfuro, lo que produce inactivación enzimática (Zorrilla, 2002). Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de  $H_2O_2$  y carbonilos (Chihuailaf, 2002).

### **Ácido Desoxirribonucleico**

Los daños en el ADN pueden provocar la detención del ciclo celular (arresto celular), inducción de la transcripción, estímulo de vías de señalización, errores en la replicación e inestabilidad genómica, procesos asociados con la carcinogénesis y oxidación del genoma. Se sabe que el daño oxidativo sobre el ADN producido específicamente por el  $\cdot OH$ , conduce a diversas modificaciones, principalmente en la desoxirribosa, provocando una liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar, (Delgado, 2010) esto produce la fragmentación de una o ambas cadenas ocasionando deleciones que dan como resultado mutaciones, reordenamientos cromosómicos, activación o inactivación de genes, fragmentación de cadena sencilla y en el momento de la replicación esta fragmentación influye en la erosión telomérica acelerando el acortamiento (Venero, 2002; Echeverri, 2010). Además, si los sistemas de reparación del ADN son superados, por el EOX se puede inducir el proceso de apoptosis, cuando la reparación es imposible o el daño fue extensivo, estas modificaciones pueden conducir a la mutagénesis y carcinogénesis (Lee, 2004; Quintanar, 2009).

### **Sistema antioxidante**

Para aminorar el daño producido por las ERO, las células tienen un sistema antioxidante capaz de estabilizar a los RL y neutralizar sus efectos, entre las enzimas antioxidantes están; la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GSSG-R), entre otras. Además de un complejo de moléculas antioxidantes como la vitamina C, vitamina E, polifenoles y el glutatión (GSH).

## **Glutati3n**

Por otra parte, una de las mol3culas antioxidantes es el GSH que consiste del trip3ptido formado por los amino3cidos: 3cido glut3mico, glicina y ciste3na (Glu-Gly-Cys), tiene un enlace  $\gamma$ -glutamilo y un grupo tiol libre. El primer enlace impide que el GSH sea hidrolizado por las  $\alpha$ -peptidasas. El segundo hace que el GSH sea extraordinariamente reactivo con otras sustancias (Cisneros, 2011). Tiene importantes funciones como antioxidante, es parte de la detoxificaci3n de xenobi3ticos, cofactor para las reacciones de isomerizaci3n, almacenamiento y transporte de ciste3na, proliferaci3n celular y participa en la apoptosis, ya que la disminuci3n de la cantidad de GSH es permisiva para la activaci3n de caspasas. Una funci3n muy importante del GSH es mantener el potencial de 3xido-reducci3n de la c3lula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las prote3nas y as3 permite la generaci3n de diversas cascadas de se3alizacion intracelular. (Mart3nez, 2006).

Durante la detoxificaci3n de las ERO, el GSH est3 involucrado en dos tipos de reacciones: la interacci3n no enzim3tica con radicales como el an3n  $O_2^-$ ,  $NO\cdot$ , y radical  $\cdot OH$ . Otra forma es proporcionando un electr3n para la reducci3n de  $H_2O_2$  en la reacci3n catalizada por la GPx. El producto final de la oxidaci3n de GSH es el disulfito de glutati3n (GSSG, constituido por dos mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro) el cual es regenerado por la GSSG-R enzima que transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta mol3cula. Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GSSG-R el GSH no es consumido, pero es reciclado y as3 puede de nuevo ser utilizado cuando se requiera. Por otro lado, durante la generaci3n de conjugados S-GSH por la GST o por la liberaci3n de GSH, el nivel total de GSH disminuye dentro de la c3lula. Por lo tanto, el GSH utilizado para esos procesos tiene que ser reemplazado por s3ntesis de novo (Mart3nez-Samano, 2011).

## **Enzimas antioxidantes**

### **Super3xido dismutasa**

La SOD, tiene importantes funciones antioxidantes en la conversi3n de radicales  $O_2^-$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  seguida de degradaci3n adicional del  $H_2O_2$  el cual es f3cilmente metabolizado a agua mediante CAT y GPx. Se han descrito tres isoformas de SOD en humanos, que incluyen a la SOD1: SOD cobre-zinc (SOD Cu-Zn), la SOD2: SOD Manganeseo (SOD-Mn) y la SOD3: SOD Extracelular (EC-SOD) (Vargas, 2009).

La SOD Cu-Zn es un homodímero encontrado en el citosol del medio intracelular, la SOD-Mn se sintetiza en el citosol antes de transportarse a las mitocondrias, donde el homotetrámero activo es para neutralizar los RL producidos durante el metabolismo aerobio su expresión es inducida por estímulos mecánicos, químicos y biológicos como el choque térmico, radiaciones ultravioleta, metales pesados y EOX, por último la EC-SOD es un tetrámero encontrado de modo exclusivo en dominios extracelulares (Cota, 2014).

### **Catalasa**

La CAT, es una enzima antioxidante en la defensa del organismo contra el EOX, se encuentra dentro de los peroxisomas de las células y el citoplasma de los eritrocitos. Se expresa en todos los tejidos, mayormente en el hígado y los riñones. La CAT consiste en cuatro subunidades idénticas que contienen en el sitio catalítico un grupo hemo (Peraza-Reyes 2008), a diferencia de otras enzimas que requieren de sustrato reducido, las catalasas dismutan el  $H_2O_2$  en agua y dioxígeno evitando que se forme el radical  $\cdot OH$  y  $^1O_2$  (Díaz, 2003)

La CAT contiene moléculas de NADPH y se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero poca afinidad al sustrato. Tiene dos funciones, catalítica y peroxidativa. En la reacción catalítica utiliza como donadores a otras moléculas de  $H_2O_2$  (Cota, 2014), en la reacción peroxidativa utiliza como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. La primera reacción tanto del mecanismo catalítico como peroxidativo es heterólisis o rompimiento de los enlaces oxígeno-oxígeno, en la reacción catalítica se transfieren dos electrones de la enzima a un oxígeno para formar agua (Peraza-Reyes 2008).

### **Glutación peroxidasa**

La GPx es el nombre genérico de un grupo de isoenzimas que poseen una triada catalítica compuesta de selenocisteína, glutamina y triptófano; se conocen cuatro enzimas mayoritarias en los tejidos de los mamíferos, son dependientes de selenio, catalizan la reducción de  $H_2O_2$  y también la reducción de lipoperóxido, utilizando GSH como agente reductor (Lubos, 2011; Cota, 2014). Tres de ellas son tetraméricas (GPx-1, -2 y -3) y una monomérica (GPx-4), GPx-1 es citosólica, GPx-2 gastrointestinal, GPx-3 plasmática y GPx-4 de hidropéroxidos de fosfolípidos (Cota, 2014).

La capacidad reductora de las GPx se basa en altas concentraciones de GSH. Durante el mecanismo catalítico de la GPx el selenol reacciona con el peróxido para dar ácido selénico, aquí es donde se une el primer GSH formando agua y la conjugación de

proteína Se-SG, se enlaza a un segundo GSH produciendo Se-GH mas H<sup>+</sup> y el GSSG. El GSSG formado durante la reacción es reducido por la enzima GSSG-R utilizando NADPH como cofactor, (Cárdenas- Rodríguez *et al.*, 2008).

Todas las isoformas de GPx pueden reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxidos de alquilo, hidroperóxidos de ácidos grasos, sin embargo, GPx-4 también reduce hidroperóxidos en lipoproteínas y lípidos complejos tales como los derivados de ésteres de colesterol, colesterol y fosfolípidos (Zuluaga, 2012).

### **Glutación-S-transferasa**

La familia de las GST son multifuncionales localizadas en el citosol, las mitocondrias y la membrana celular. Son enzimas de desintoxicación fase II que mediante conjugación con el GSH, metabolizan xenobióticos, contaminantes, y los subproductos del EOx, (Galleguillos, 2012). Esta enzima cataliza la conjugación del grupo sulfhidrilo entre el grupo tiol del GSH y gran número de especies electrofílicas en sustratos hidrofóbicos. Esta conjugación aumenta la solubilidad del producto facilitando su excreción de la célula (Vararattanavech, 2003)

### **Glutación reductasa**

La GSSG-R es homodimérica compuesta por dos unidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro. El sistema antioxidante GPx y GSSG-R está relacionado con otros sistemas antioxidantes como la SOD/CAT. Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la CAT y de la GPx esta inversamente correlacionada, mientras que la CAT y GSSG-R presentan correlación positiva.

La GSSG-R permite mantener concentraciones de GSH en la célula no solo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C y E luego de participar en la eliminación de RL generados *in situ* o a distancia

### **Antecedentes de Estrés oxidante en Síndrome de Marfán**

La incidencia del SM es de 1 caso por cada 5,000 habitantes, es una enfermedad compleja causada por múltiples factores, por lo tanto, es posible que el exceso de la producción de las ERO sea factor que contribuya a la degeneración de la pared arterial, disfunción endotelial y formación de aneurisma aórtico (Ramírez, 2012).

Por otro lado, las ERO activan a las metaloproteasas de la matriz, esto implica extensa degradación de la matriz extracelular (Fiorillo, 2010) que se caracteriza por el debilitamiento y dilatación localizada de la pared aórtica lo que sugiere su participación en la patogénesis de los aneurismas aórticos (Ejiri, 2003).

Por otra parte, resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio indican que en pacientes con SM la actividad de la expresión de las enzimas que utilizan GSH están disminuidas al igual que el FRAP (poder antioxidante de reducción ferrica) y el índice de LPO incrementado, mientras que en suero se encontró que el FRAP esta disminuido y la carbonilación incrementada. Por otro lado, el mecanismo por el cual se producen las ERO que contribuyen al daño aórtico en el SM no está bien definido. Sin embargo, se ha observado que la expresión de la enzima iNOS esta incrementada al igual que los nitratos y nitritos, lo que indica que parte del daño oxidativo de estos individuos también es causado por ERN (Soto, 2014). Así mismo, en modelos animales se ha observado que la expresión de las enzimas precursoras del  $O_2^-$ , xantina oxidasa y NADPH oxidasa están incrementadas al igual que la expresión de la iNOS que es precursora del NO en el proceso de inflamación. La tasa de reacción existente entre el NO y el  $O_2^-$  es tres veces mayor que la tasa de reacción entre el  $O_2^-$  y la SOD, esto promueve la formación del ONOO<sup>-</sup> y su acumulación dentro de la célula, lo que incrementa el daño celular por oxidación (Yang, 2010).

Además, recientemente surgieron evidencias sobre el papel del TGF- $\beta$ , el cual altera la vía de señalización y participa en la patogénesis del SM. Se conoce que la matriz extracelular regula la activación y disponibilidad del TGF- $\beta$  debido a que existe defecto o deficiencia de fibrilina-1, la matriz extracelular produce mayor liberación y activación de TGF- $\beta$ , y se ha descrito que el Smad-dependiente y el ERK dependiente no canónico de la vía de señalización de TGF- $\beta$  contribuyen al desarrollo del aneurisma de la raíz aórtica en modelos de ratón con SM (Wilton, 2007).

## **JUSTIFICACIÓN**

Dado que hay gran número de síndromes similares al de SM, se requiere hacer el diagnóstico diferencial temprano que permita el pronto manejo de los enfermos y así evitar graves complicaciones.

En el LDS, variante del SM, las características principales son: la presencia de aneurismas cerebrales, de aorta torácica y abdominal, siendo esta la principal causa de muerte. Publicaciones anteriores en los aneurismas del SM, indican que el EOx participa en la patogenia del tejido aórtico. Sin embargo, en el síndrome LDS no se ha descrito la participación del EOx, en la formación del aneurisma.

## **HIPÓTESIS**

En el SM, la participación del EOX en el aneurisma del tejido aórtico ya ha sido descrita sin embargo no se ha descrito nada en el síndrome de LDS una variante del SM. Por lo que se espera que en el aneurisma aórtico de pacientes con síndrome LDS la actividad de las enzimas antioxidantes esté alterada.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Analizar la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes en la aorta torácica de pacientes con síndrome LDS.

### **Particular**

- Identificar el daño de la pared aortica.
- Determinar la actividad de las enzimas: GPx, GSSG-R, GST, CAT y SOD.
- Cuantificar el índice de LPO, FRAP y GSH/GSSG
- Medir la expresión de la enzima eNOS.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Consideraciones éticas**

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de investigación y ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (protocolo institucional numero 09654). Para cada uno de los pacientes e individuos control se presentó el consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki, modificada en el Congreso de Tokio, Japón (WMA, 2002).

### **Criterios de inclusión**

#### **Pacientes**

Hombres y mujeres que ingresaron al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Los pacientes involucrados en el estudio fueron diagnosticados con LDS por el médico especialista y cumplieron con el criterio de dilatación aórtica para ser sometidos a cirugía. El número de pacientes diagnosticados con LDS de marzo de 2011 a marzo de 2015 es de cinco, tres hombres y dos mujeres con edades de 13-38 años.

#### **Controles**

Hombres y mujeres que ingresaron al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, que fueron diagnosticados sin SM o alguna de sus variantes y que se hayan sometido a cirugía.

El total de pacientes que fueron utilizados como control son cinco: tres hombres y dos mujeres con edades de 58-72 años.

Los segmentos de aorta fueron extraídos mediante cirugía, posteriormente fueron puestos en solución fisiológica y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -30 °C hasta su utilización.

#### **Homogeneización de aorta.**

Las muestras de aorta fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido, y politronadas en solución de sacarosa [0.25mM sacarosa, 10mM Tris, 1mM de etilendinitrilotetracetato disódico (EDTA) a pH 7.35], en presencia de inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 2 µM pepstatina A, 2 µM leupeptina y 0.1% de aprotinina) después se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue separado y almacenado a -30°C. La determinación de proteína fue realizada por el método Bradford (Bradford, 1976).

### **Detección de las enzimas antioxidantes SOD Mn, SOD Cu Zn y CAT en geles nativos de poliacrilamida**

La determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se realizó después de haberlas separado mediante geles nativos de poliacrilamida, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1979). El gel concentrador al 4% contenía 2.28 mL de agua desionizada y destilada, 1 mL de buffer pH 6.7, 0.66 mL de solución de acrilamida/ bisacrilamida 30%, persulfato de amonio a 0.010% y TEMED 0.01% el gel resolvente al 8% se elaboró con 4.73 mL de agua desionizada y destilada, 2.53 mL de amortiguador pH 8.9, 2.43 mL de solución de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 0.008% de persulfato de amonio y 0.02% de TEMED. Los geles fueron cargados con 100 ng de CAT (Sigma C-40), 100 ng de SOD de hígado de bovino (Sigma S-2515) como estándar y 100 µg de proteína proveniente de los homogenizados de aorta. La electroforesis se corrió con amortiguador de tris-glicina pH 8.3 a 15- 25 mA.

Al término de la electroforesis y para determinar la actividad de la CAT el gel se lavó con agua destilada por 10 min tres veces, e incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 min, pasado este tiempo se decantó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó con una mezcla al 1% de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y 1% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O por 10 min en la oscuridad y después se lavó con agua destilada.

Para determinar la actividad de la SOD, el gel se incubó con 2.45 mM de NBT (Sigma) por 20 min, después se lavó con una solución que contenía EDTA 28 mM, rivoflavina 0.028 mM, en amortiguador de fosfatos 36 mM, pH 7.8, durante 15 min, posteriormente se expuso a una lámpara de luz UV durante 10 min y se enjuagó con agua destilada. Los geles CAT y SOD se analizaron por imagen (píxeles) con el programa Kodak versión image 3.5.

### **Actividad de la Glutación Peroxidasa**

A 100 µg de proteína de homogenizado de aorta se le agregaron 1.6 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 que contenía N<sub>3</sub>Na 6.5 mg, EDTA 1 mM, NADPH 0.2 mM, GSH 1 mM y glutación reductasa 1 U/L, y a 37°C por 5 min se midió la absorbencia a 340 nm, se monitoreo la absorbencia a 340 nm (Flohé, 1984).

### **Glutación-S-transferasa**

La actividad de la enzima GST se midió por espectrofotometría. A 100 µg de proteína del homogenizado de aorta se le agregó 1.6 mL de buffer fosfato 50 mM, pH 7.3, más 300 µL

de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzina) 10 mM y 300  $\mu$ L de GSH 10 mM. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C, posteriormente se leyó la absorbencia a 340 nm.

Los valores de la actividad de la GST se expresa en unidades de GST por minuto, una unidad de actividad de GST se define como un  $\mu$ mol de GS-DNB por minuto a 37°C (Vararattanavach, 2003).

### **Glutación reductasa**

A 100  $\mu$ g de proteína del homogenizado de aorta se le agregaron 800  $\mu$ L de buffer fosfato 0.2 mM, pH 7.3, más 0.5 mM de EDTA, 100  $\mu$ L de NADPH 0.1 mM, y 100  $\mu$ L de GSSG 1mM, se incubó a 37°C por 10 minutos, la absorbencia se leyó a 340 nm. La actividad de la GSSG-R se expresa en  $\mu$ mol de GSSG reducido por minuto por mg de proteína (Deponte, 2013).

### **Glutación reducido**

100  $\mu$ g de proteína del homogenizado de aorta se desproteinizó con ácido tricloroacetico al 20%, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, después se recuperó el sobrenadante al cual se le agregaron 900  $\mu$ l de buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50mM, pH 7.3, más 100  $\mu$ L de reactivo de Ellman (5,5' dithiobis 2-nitrobenzoico) 1M, se incubó a temperatura ambiente por 5 min, la absorbencia se leyó a 412 nm. La curva de calibración se realizó con GSH a una concentración de 5 a 25  $\mu$ mol/mL (Ellman, 1959).

### **Glutación oxidado**

100  $\mu$ g de proteína del homogenizado de aorta se desproteinizó con ácido tricloroacetico al 20% se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, después se recuperó el sobrenadante al cual se le agregaron 900  $\mu$ L de buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 50mM, pH 7.3, más 100  $\mu$ L de reactivo de Ellman 1M, se incubó a temperatura ambiente por 5 min, después se agregaron 8  $\mu$ L de 4-vinil-piridina, posteriormente se agitó por 5 seg en vortex, la absorbencia se leyó a 412 nm. La curva de calibración fue realizada con GSSG a una concentración de 5 a 25  $\mu$ mol/mL (Ellman, 1959).

### **Determinación de eNOS por inmunotransferencia**

100  $\mu$ g de proteína de homogeneizado de aorta se mezcló con amortiguador de carga (glicerol 59% vol/vol; tris HCl, pH 6.5; SDS 1%, azul de bromofenol 0.1%, 2-mercaptoetanol 0.05%). La mezcla se calentó a 100° C por 1 min. Las proteínas fueron separadas en gel de SDS/PAGE al 8% bajo condiciones reductoras, al término de la

electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa 45 $\mu$ m Hybond-P. La membrana fue bloqueada durante 3 horas con TBS (buffer de Tris-Glicina pH 7.4) que contenía 5% de leche deshidratada desgrasada y Tween- 20 al 0.05%.

Después la membrana se incubó con una dilución 1/500 a concentración final de 400 ng/mL de anticuerpo primario policlonal de conejo contra eNOS, se dejó agitar por una noche a 4°C, posteriormente la membrana se enjuagó tres veces con TBS e incubó con una dilución 1/1250 a concentración de 320 ng/ml de anticuerpo secundario policlonal de cabra anti IgG de conejo por 3 h a temperatura ambiente, el revelado se hizo con 3'3'diaminobenzidina. Después de identificar la proteína problema, la membrana se lavó con amortiguador de 1% de TRIS, 1% de SDS y 100 mM de  $\beta$ - mercaptoetanol pH 2 por 2 horas, pasado el tiempo se lavó con TBS, después se bloqueó por 3 horas e incubó durante la noche con una dilución 1/1000 con una concentración de 100 ng/mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti  $\beta$ -actina biotinilados, y se reveló con 3'3'diaminobenzidina. La membrana se analizó por imagen (píxeles) mediante el programa Kodak versión image 3.5 (Pérez *et al.*, 2009).

### **Capacidad antioxidante total**

La evaluación de la capacidad antioxidante del sistema no enzimático por el método FRAP. Se basa en la reacción de los antioxidantes presentes en la muestra y el cloruro de hierro (FeIII) en un medio ácido, formándose ion ferroso (FeII), el cual es capaz de unirse al 2,4,6,-Tris2-pyridil-s-triazine para generar un compuesto color azul. A 1 mg de proteína del homogeneizado de aorta se le agregaron 1.5 mL de mezcla de reacción; la cual consistió de 300 mM de amortiguador de acetatos pH 3.6, 20 mM de hexahidrato de cloruro férrico, 10 mM de 2,4,6,-Tris2- pyridil-s-triazine disuelto en 40 mM de HCl en relación 10:1:1 v/v respectivamente; se mezcló vigorosamente en vortex por 5 segundos y se incubó a 37°C por 15 min en oscuridad, finalmente se centrifugó a 5000 rpm. La absorbencia se midió a 593 nm en un espectrofotómetro (UNICO UV 2100). Para la curva de calibración se utilizó 1.5 mL de la mezcla de reacción y 50  $\mu$ L de la dilución de TROLOX (ácido 6-hidroxi-2-5-7-8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Zuñiga et al., 2013).

### **Índice de lipoperoxidación**

En el homogeneizado de aorta, se midió el índice de LPO, un marcador de daño causado por los RL a los lípidos insaturados de la membrana celular, con el método convencional de TBARs (Thiobarbituric acid reactive substances, por sus siglas en inglés). El ensayo de

TBARs se fundamenta en la reacción del MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico en medio ácido y a temperatura aproximada de 100°C, formando un complejo colorido.

A 100 µg de proteína, se le agregaron 50 µL de metanol con BHT al 4% y 1 mL buffer de fosfatos a pH 7.4, se mezcló vigorosamente en vortex durante 5 segundos, e incubó 30 min en baño maría a 37°C. al finalizar de la incubación, se agregó 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0.8 M volviendo a incubar durante 1 h en baño maría a 100°C, después de ese tiempo y para detener la reacción, las muestras fueron colocadas en hielo, adicionando 1 mL de KCl al 5% más 5 mL de n-butanol, se mezcló vigorosamente con vortex durante 30 s y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 376 g a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se extrajo la fase de n-butanol y se midió la absorbencia a 532 nm. La curva de calibración se realizó utilizando tetraepoxipropano (Sigma) (Pérez, 2009)

### **Histología**

Para la histología, 2 mm de segmentos de aorta fueron lavados con 0.9% de NaCl por 30 segundos. La solución fue decantada, después se añadió buffer de fosfatos con 10% de formalina por 24 horas, posteriormente se hicieron tinciones de hematoxilina-eosina, Masson, y Weigert según los protocolos estándar del laboratorio (Lee, 1999), las secciones histológicas fueron analizadas usando microscopio de luz Carl Zeiss modelo 63300 equipado con cámara digital Tucsen 9 Mpx con software TSview 7.1, con magnificación de 40X. Las microfotografías fueron analizadas usando el programa Sigma Scan Pro5 Image Analisis Software. Los valores fueron expresados en unidades por pixel.

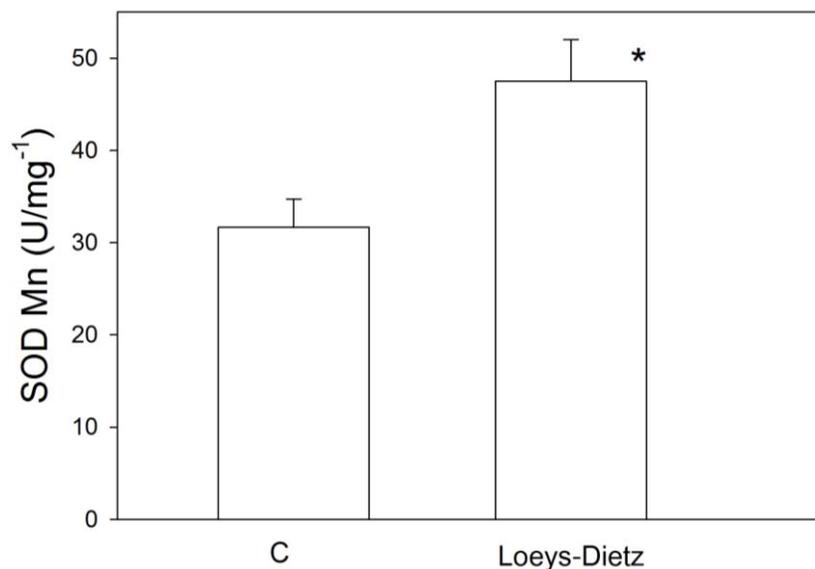
## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se presentan con la media  $\pm$  error estándar. La diferencia estadística se determinó por la prueba t de Student. Una  $P < 0.05$  se consideró como significativa. Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Richmond, California, USA).

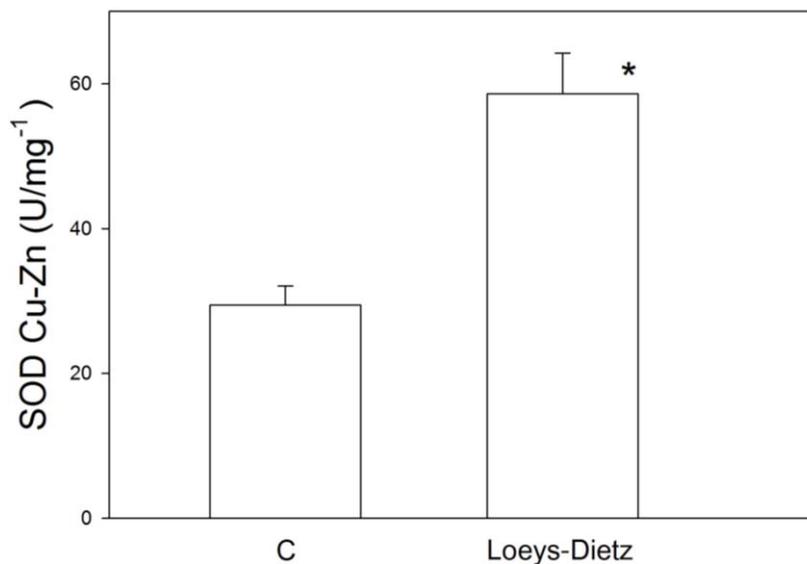
## RESULTADOS

### Actividad enzimática

La actividad de la SOD-Mn y de la SOD Cu-Zn presentaron cambios significativos en comparación con el grupo control (Figuras 2 y 3).

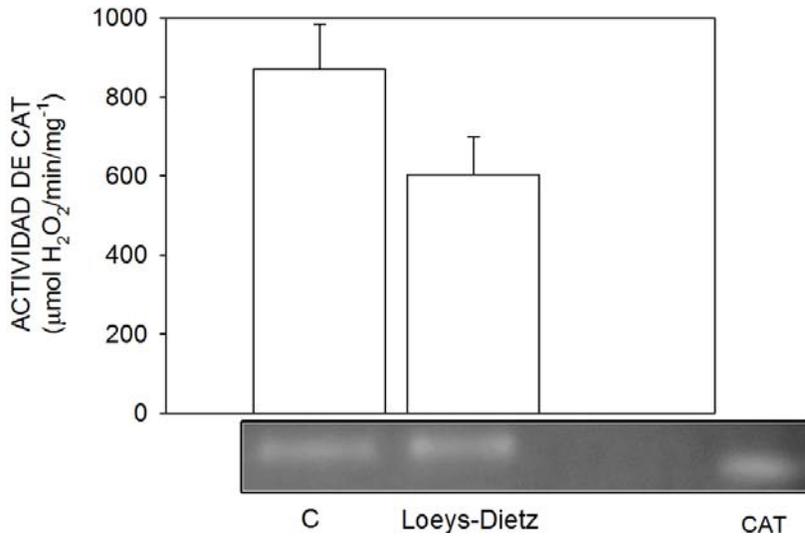


**Figura 2.** Actividad de la enzima SOD-Mn en los pacientes con LDS en comparación con el control \*P=0.001, los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.



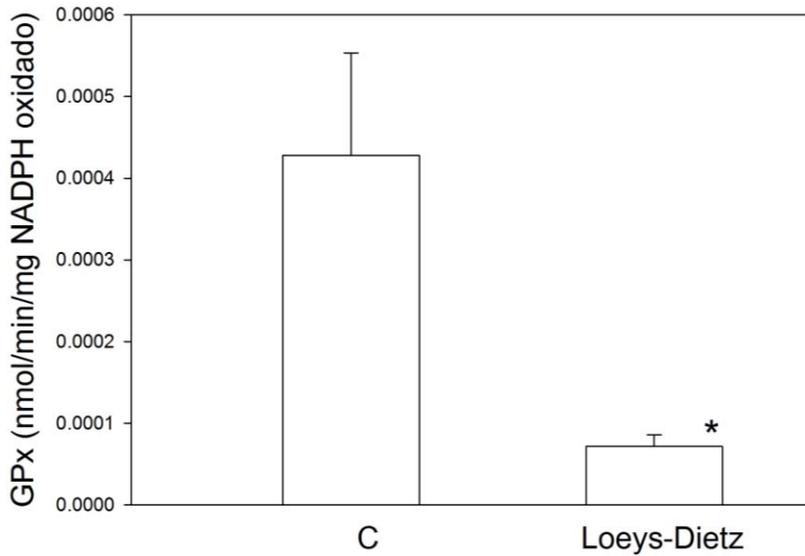
**Figura 3.** Actividad de la enzima SOD Cu-Zn en los pacientes con LDS en comparación con el grupo control \*P=0.003, los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.

La actividad de la CAT en los pacientes con LDS se observó con tendencia a disminuir sin alcanzar significancia en comparación con el grupo C (figura 4)



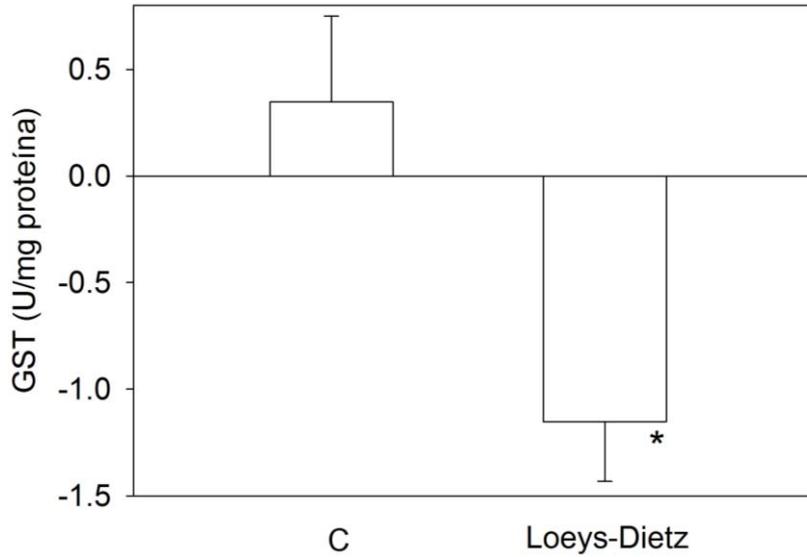
**Figura 4.** Actividad de la enzima CAT. Los resultados expresan media  $\pm$  error estándar. a) imagen representativa de la electroforesis de CAT.

La actividad de la GPx disminuyó significativamente en el grupo de pacientes con LDS en comparación con el grupo control (figura 5).



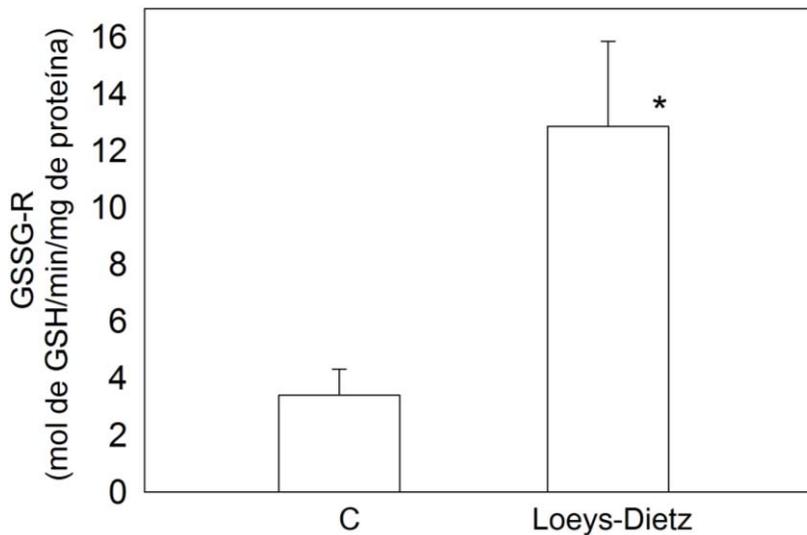
**Figura 5.** Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en los pacientes con LDS en comparación con el grupo control \*P<0.01, los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.

Los resultados de la GST mostraron disminución significativa en el grupo de pacientes con LDS en comparación con el grupo control (figura 6).

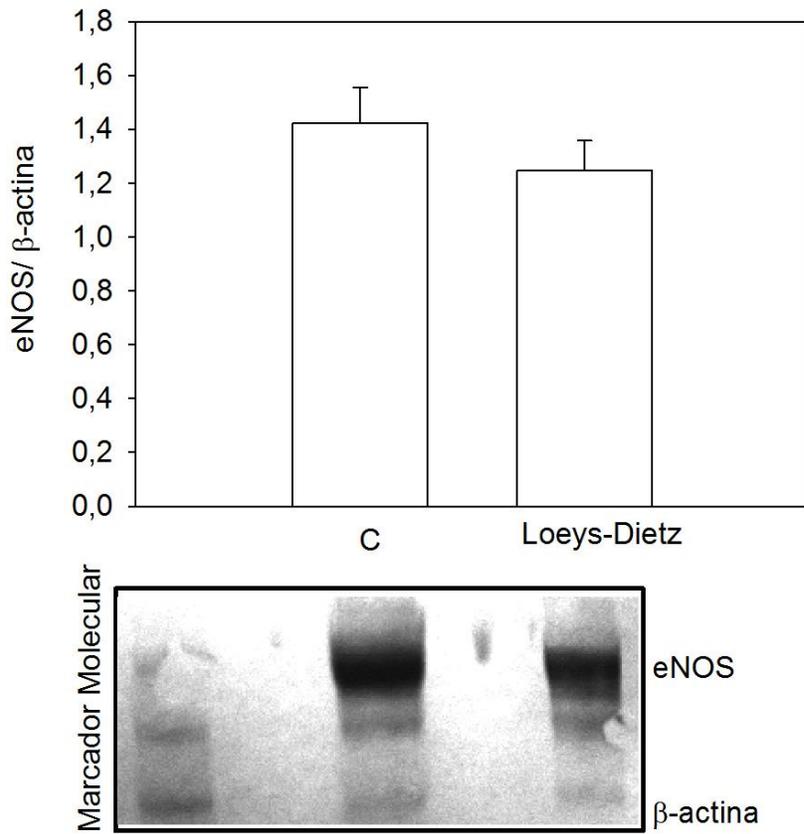


**Figura 6.** Actividad de la enzima Glutación-S-transferasa en el grupo de pacientes con LDS en comparación con el grupo control \*P<0.02, los resultados expresan la media ± error estándar.

La GSSG-R se encontró aumentada significativamente en el grupo de pacientes con LDS en comparación del grupo control (figura 7).



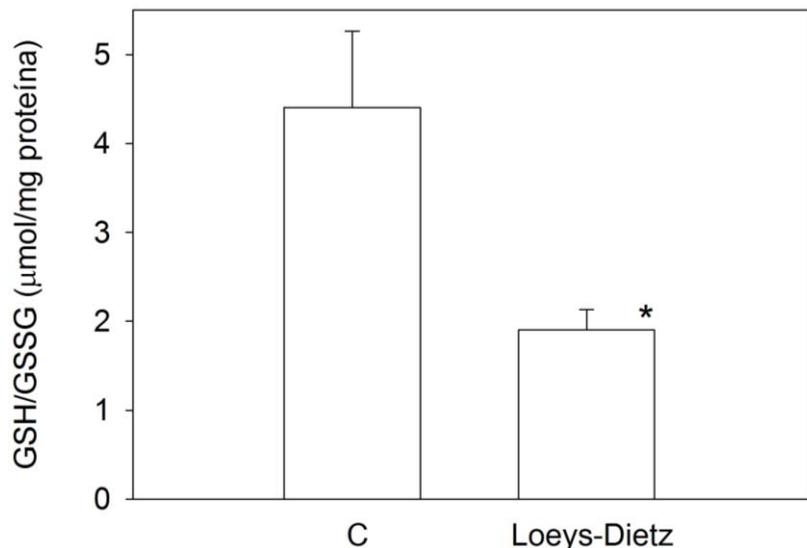
**Figura 7.** Actividad de la enzima Glutación reductasa en el grupo de pacientes con LDS en comparación del grupo control \*P<0.02, los resultados expresan la media ± error estándar. La expresión de la eNOS presentó tendencia a disminuir en el grupo de pacientes LDS, en comparación con el grupo (figura 8).



**Figura 8.** Expresión de la sintasa de oxido nitrico endotelial. Los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar a) imagen representativa de la inmunotransferencia de eNOS.

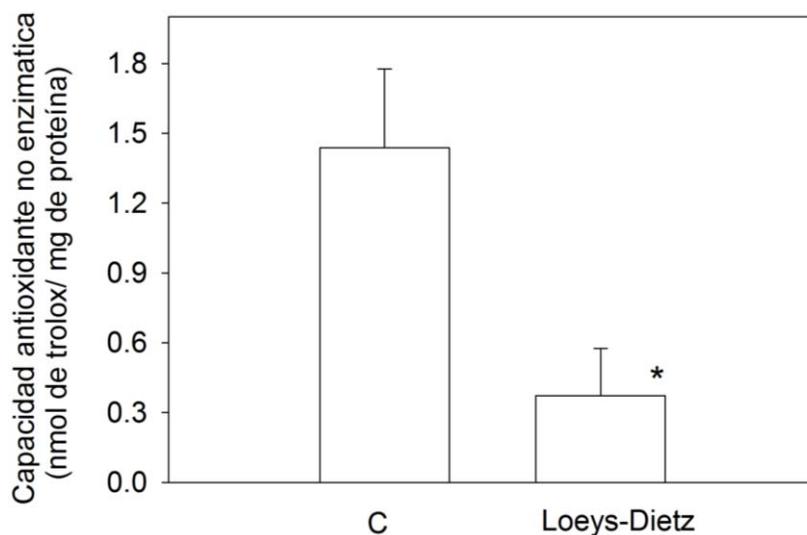
### Sistema antioxidante no enzimático

La relación de GSH/GSSG disminuyó, con significancia de  $P < 0.04$  en el grupo de pacientes con LDS en comparación con el grupo C, los resultados son mostrados en la figura 9.



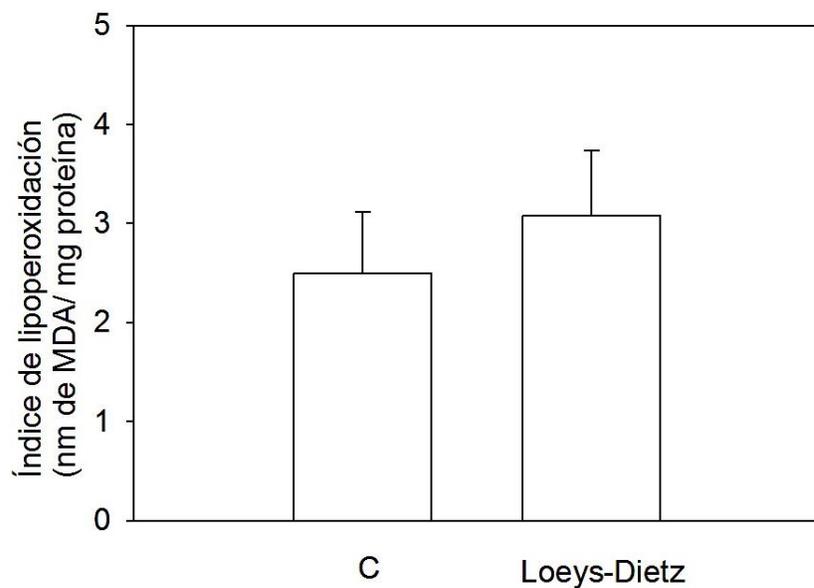
**Figura 9.** Relación glutatión reducido/ glutatión oxidado en el grupo LDS en comparación con el grupo control \* $P < 0.04$ , los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.

La capacidad antioxidante no enzimática total, se encontró disminuida significativamente en los pacientes LDS en comparación con el grupo control (figura 10).



**Figura 10.** Capacidad antioxidante del sistema no enzimático en el grupo con LDS en comparación con el grupo Control \* $P = 0.03$ , los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.

El índice de lipoperoxidación tendió a elevarse sin alcanzar significancia en el grupo de pacientes con LDS en comparación del grupo control (figura 11).



**Figura 11.** Índice de lipoperoxidación. Los resultados expresan la media  $\pm$  error estándar.

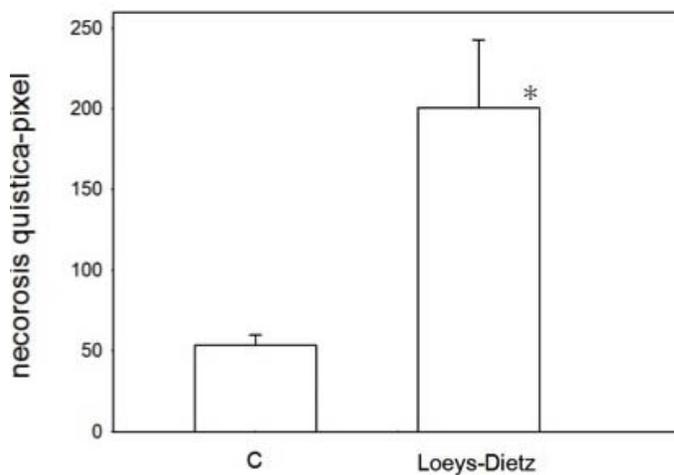
## Histología

### Tinción Hematoxilina-Eosina

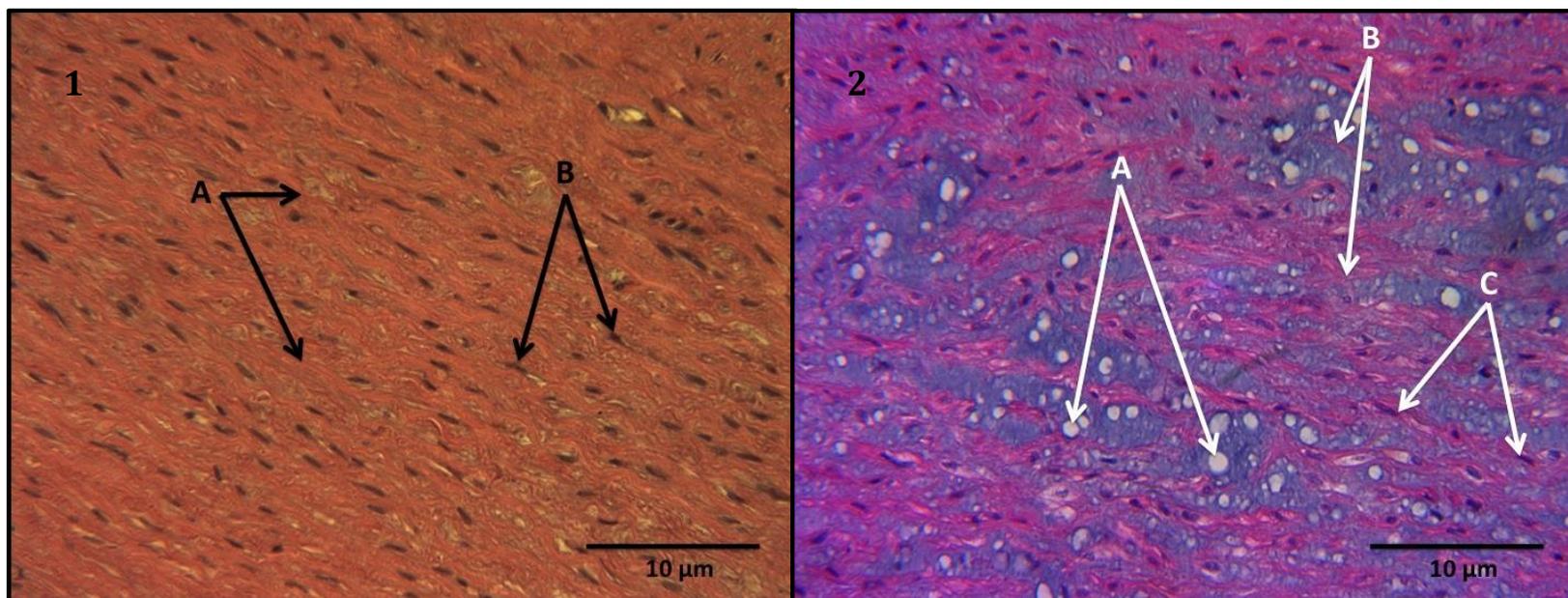
La necrosis quística en el grupo de pacientes con LDS fue mayor en comparación con el grupo control. La figura 12 muestra las mediciones en pixeles de necrosis quística.

En la figura 12.1 se observa la fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente control, mostrando en color negro núcleos de fibrocitos dispuestos en fasciculos, en rojo fibras elásticas, en color rosa fibras de colágena, sin presencia de necrosis quística.

En la figura 12.2 se observa la fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente con LDS, mostrando en color azul nucleos de fibrocitos dispuestos en fascículos, en rojo fibras elásticas y en rosa fibras de colágena, en color blanco, se observa la presencia de necrosis quística.



**Figura 12.** Necrosis quística del grupo Loey Dietz en comparación con el Control \*P=0.002, los resultados expresan la media ± error estándar.



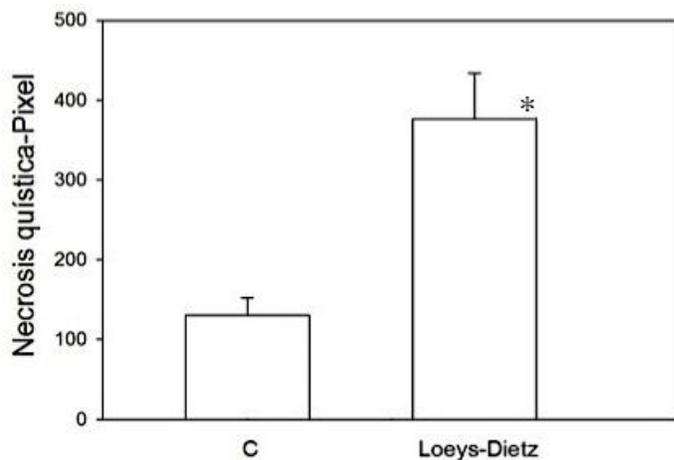
**Figura 12.1)** fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un individuo Control, tinción hematoxilina-eosina 40X. A) fibras elásticas en color rosa intenso B) Núcleos de fibrocitos en color oscuro. **12.2)** Fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente con LDS, tinción hematoxilina-eosina 40X. A) Necrosis quística, con acumulación de material amorfo. B) Fibras elásticas y de colágena en color rojizo y rosa intenso C) núcleos de fibrocitos teñidos en color azul.

### Tinción Tricrómica de Masson

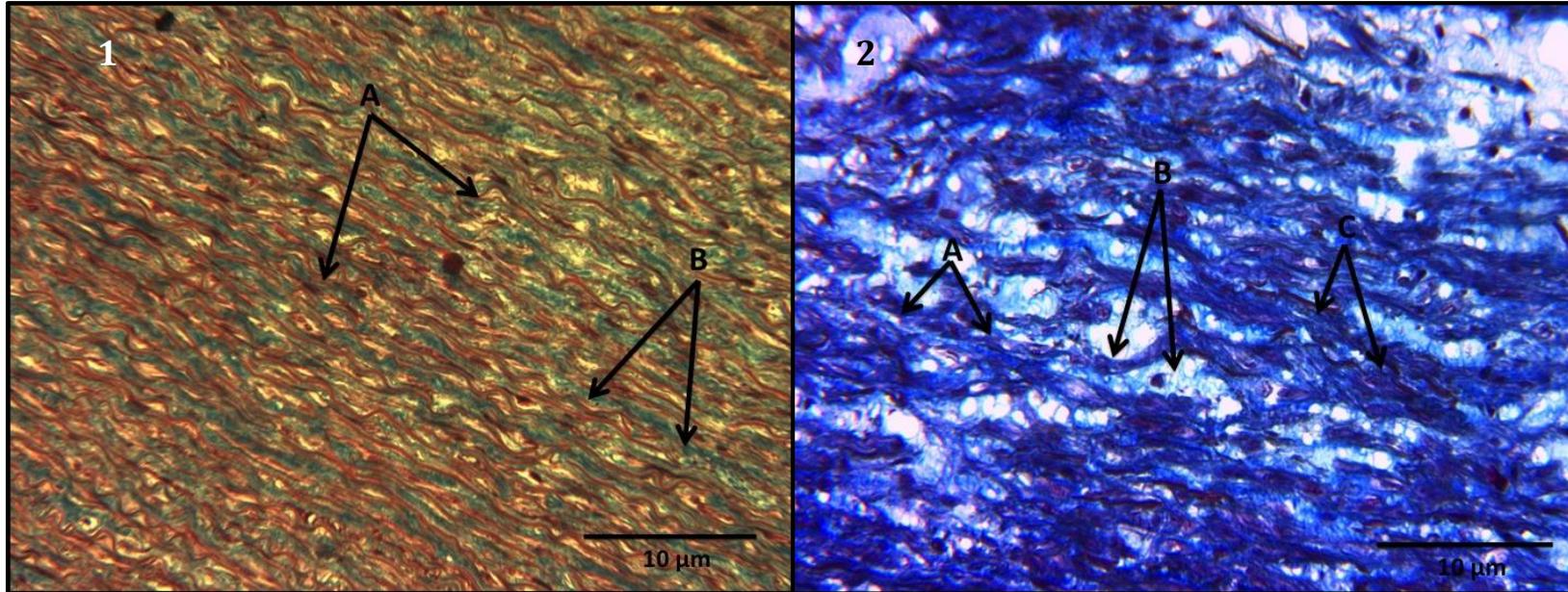
La necrosis quística del grupo LDS fue mayor en comparación con el grupo control. La figura 13 presenta las mediciones en pixeles de la necrosis quística.

La figura 13.1 muestra la Fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un sujeto control, se observan fibras elásticas en color rojo, en azul fibras de colágena y no se observa presencia necrosis quística.

La figura 13.2 muestra la fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente con LDS, se observan fibras elásticas en color rojo, en azul fibras de colágena y en blanco se observa necrosis quística con presencia de material amorfo en azul tenue.



**Figura 13.** Necrosis quística en el grupo Loey Dietz en comparacion con el Control  
\*P=0.001, los resultados expresan la media ± error estándar.

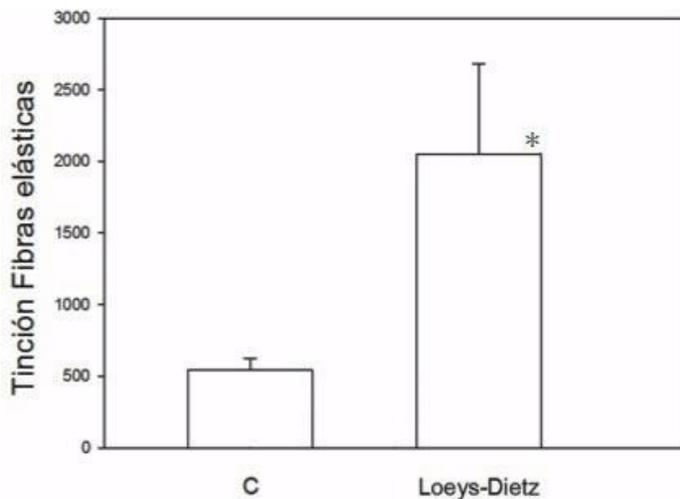


**Figura 13.1)** Fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un individuo Control, tinción tricrómica de Masson 40X. A) Fibras elásticas en color rojo B) Fibras de colágena en color azul. **13.2)** fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente con LDS, tinción tricrómica de Masson 40X. A) Fibras de colágena en color azul intenso. B) Necrosis quística con presencia de material amorfo en color azul tenue C) Fibras elásticas en color rojo.

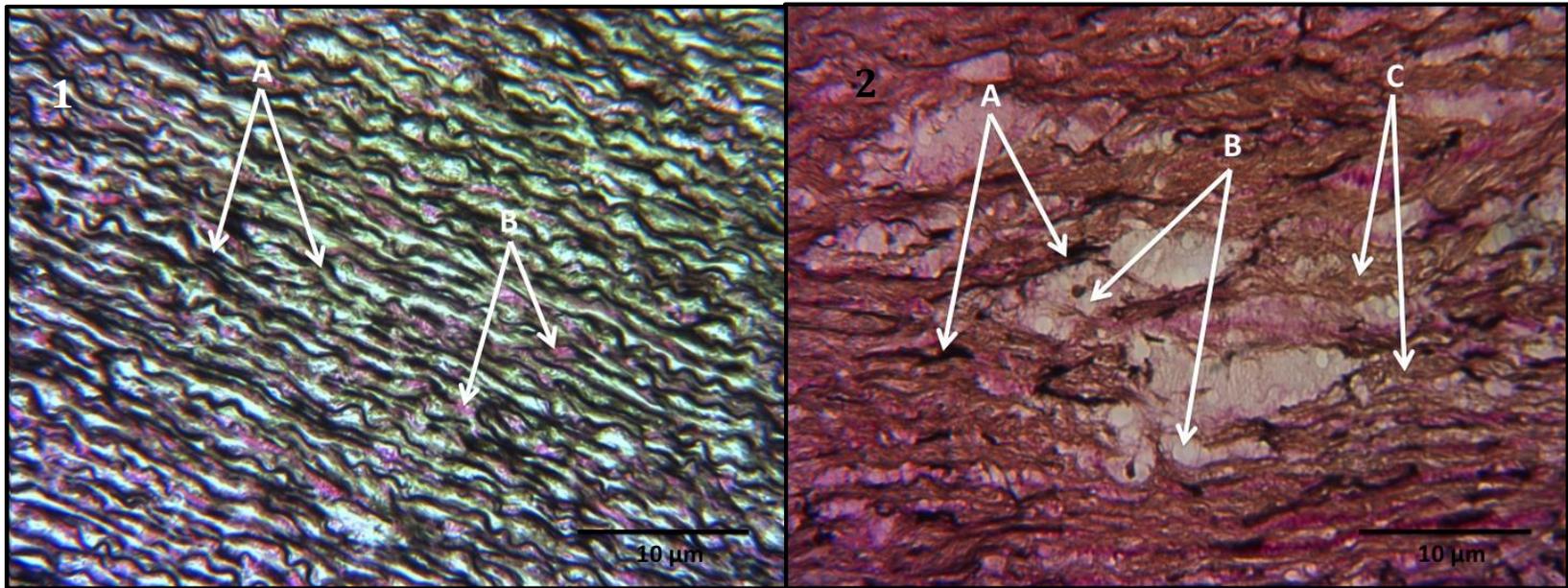
### Tinción Weigert

La fragmentación de las fibras elásticas en el grupo LDS presenta cambios significativos en comparación con el grupo Control. La figura 14 presenta las mediciones en pixeles de la fragmentación de las fibras elásticas.

La figura 14.1 muestra la fotomicrografía representativa de pared media aortica de un sujeto control, en color negro se observan las fibras elásticas, en café-amarillo fibras de colágena, no se distingue necrosis quística. La figura 14.2 muestra la fotomicrografía representativa de la pared media aortica de un paciente con LDS, en color negro se observan las fibras elásticas fragmentadas, en café-amarillo fibras de colágena y en color blanco se distingue necrosis quística.



**Figura 14.** Fragmentación de las fibras elásticas en el grupo Loays Dietz en comparación con el control \*P=0.001, los resultados expresan la media ± error estándar.



**Figura 14.1)** Corte histológico de la aorta de un individuo Control. Tinción Weigert 40X. A) Fibras elásticas en color negro B)Fibras de colágena y elastina en color rosa y color pardo claro. **14.2)** Corte histológico de la aorta, de un paciente con LDS, tinción Weigert 40X. A) Fibras elásticas B) Necrosis quística C) Fibras de colágena.

## DISCUSIÓN

El LDS, una variante del SM, como toda enfermedad genética compleja presenta daños en diferentes órganos y sistemas, la característica principal del LDS es la presencia de AAT de progresión rápida, diferentes trabajos han mostrado que la sobreproducción de ERO puede contribuir a la degeneración de la pared arterial (Xiong, 2000). La participación de las ERO en la progresión del daño aórtico ha sido descrita en modelos animales y en diferentes patologías. Sin embargo, en el LDS hasta el momento no ha sido reportado el desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes que conlleva cambios en el estado redox de las células (Yang, 2010) y la participación en la formación del AAT. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo fue analizar la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes en la aorta torácica de pacientes con síndrome LDS.

Diversos estudios en modelos de ratón con SM describen disfunción vasomotora en la aorta torácica asociada a ERO (Soto, 2014) y alteración en las enzimas antioxidantes como la SOD. En 2013 Soto describió aumento en la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y -Mn en aortas de pacientes con SM, Turner, hipertensión arterial y algunas variantes de Márfan. Sin embargo, en 2010 Yang reportó disminución de las isoformas de SOD debido al aumento de  $O_2^-$  en la aorta torácica en un modelo de ratón con SM, lo cual relacionó con el deterioro de la función aortica, en este mismo estudio mostró que el tratamiento con SOD revirtió la hipersensibilidad de las arterias. La diferencia de los resultados entre estos dos estudios podría ser el modelo utilizado, ya que uno es en modelo murino y en el otro en pacientes con SM.

En esta investigación, los resultados de la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y -Mn aumentaron, esto sugiere que la sobreproducción de  $O_2^-$ , en el tejido aórtico puede incrementar la actividad de las isoformas de SOD. En 2003 Ejiri describe que el tejido del aneurisma de aorta torácica presenta sobreexpresión de NAD/NADPH oxidasa, esto se asocio con el aumento en la producción de  $O_2^-$ , lo que podría estimular a la SOD Cu-Zn y -Mn, aumentando la concentración de  $H_2O_2$ , esta ERO es más dañina por la capacidad de difusión en la membrana celular (Dröge, 2002). Sin embargo, una de las enzimas encargadas de la eliminación de  $H_2O_2$  es la CAT, la cual usa dos moléculas de  $H_2O_2$  para convertirlas en  $H_2O$  y  $O_2$ . La sobre expresión de la CAT previene la estimulación de EROx (Díaz, 2003). Soto, en 2013 describió que en aortas de pacientes con SM se encontró

sobre expresada la CAT, esto atribuido en parte a la exposición continua de  $H_2O_2$ . Nuestros resultados muestran que la actividad de la CAT presentó tendencia a disminuir sin alcanzar diferencia significativa. Esto se puede deber a la sobre producción de  $H_2O_2$  ya que se ha descrito que excesivas concentraciones de sustrato resultan en la inhibición de CAT (Díaz, 2003). También la excesiva concentración de  $O_2^-$  puede causar inhibición de la glucosa-6-fosfato que cataliza la formación del NADPH, que sirve como donador de electrones a la CAT (Siwik, 2001). Sin embargo la tendencia entre grupos podría llegar a ser significativa si se aumentara el número de muestra.

Por otro lado, otra de las enzimas encargadas de la detoxificación de  $H_2O_2$  es la GPx, está se encuentra en el citosol y en la mitocondria de las células de los mamíferos y se ha descrito que es más eficiente que la CAT al remover el  $H_2O_2$  intracelular bajo varias condiciones fisiológicas (Ye, 2015). Los resultados muestran que la actividad de la GPx mostró disminución en los pacientes con LDS en comparación a los sujetos C, esto puede ser debido a la baja disponibilidad de GSH, además la GPx posee Se en su sitio catalítico y se ha descrito al Se como factor limitante de la defensa antioxidante (Deponte, 2013). Además, una dieta rica en Se causa serios daños inclusive la muerte. Sin embargo, a concentraciones bajas interfiere en la síntesis de aproximadamente 25 proteínas que usan celenocisteína, así mismo la deficiencia de Se se ha descrito en patologías cardiovasculares (Nuñez, 2013) y se ha especulado que en el SM puede haber disminución de Se que podría comprometer la actividad de la GPx (Dariush, 2009) y como consecuencia decrementar su actividad.

Por otro lado, la Glutation-S-transferasa, es la enzima que se encarga de conjugar al GSH con xenobioticos, lípidos peroxidados, hidroperoxidos entre otras moléculas, para su posterior eliminación de la célula. Los sustratos utilizados por la GST son formados como consecuencia de la modificación de macromoléculas por ERO. Por lo tanto, esta enzima esta considerada como antioxidante (Serratt, 2001). En 2013 Nuñez describe la disminución de la GST en aortas de pacientes con SM. Además en otras patologías que afectan el sistema cardiovascular en humanos y modelos murinos asociadas al EOX, se ha observado disminución en la expresión de la GST aunada al incremento de la LPO (Soto, 2014).

Nuestros resultados muestran que la actividad de la GST disminuyó en los pacientes con LDS en comparación al grupo control, está índica que la actividad decrementada de la

enzima esta comprometida por la baja disponibilidad del GSH lo cual contribuye a la tendencia a incrementar de la LPO.

Por otro lado, el GSH es el principal compuesto tiol intracelular, es un triptido ( $\gamma$ -l-glutamil-l-cisteinil-glicina) producido por las células de los mamíferos, siendo el mecanismo de defensa antioxidante por excelencia contra las ERO y electrófilos (Ribas, 2014). El control de la homeostasis del GSH es a través del proceso de consumo y suministro (Circu, 2012). La función antioxidante del GSH está determinada por el grupo tiol de la cisteína, este grupo se oxida cuando el GSH reduce moléculas diana, electrófilos o ERO, posteriormente el GSH se oxida a GSSG (Ribas, 2014) y también el GSH es oxidado por la GPx y regenerado a GSH por la enzima GSSG-R, en este proceso se requiere del consumo de NADPH, este equivalente reductor se produce en la vía de las pentosas fosfato, donde la oxidación alternativa de glucosa no genera ATP, ya que su finalidad es proporcionar ribosa-5-fosfato y NADPH para la síntesis de ácidos grasos, esteroides y cofactor de GSSG-R (Dröge, 2009). Por lo tanto, la alteración de la actividad de la GSSG-R provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a aumento en los niveles de ERO. La alteración de la actividad de la GSSG-R y de los niveles de GSH por esta consecuencia se ha reportado en varios procesos patológicos asociada con aumento del riesgo al EOx (Cisneros, 2014).

Los resultados muestran que la actividad de la GSSG-R aumentó en el grupo con LDS, a pesar de esto los valores de GSH no se restablecieron, eso podría limitar la actividad de las enzimas GPx y GST. Estos resultados coinciden con lo descrito por Soto en 2014, en pacientes con SM, además sugiere que el EOx crónico en el LDS sea el encargado de oxidar al GSH interviniendo en el balance redox. Otras de las causas de la disminución del GSH pueden ser la alteración de la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintasa, encargada de la síntesis de GSH y la deficiencia de los aminoácidos que constituyen el GSH, lo cual podría predisponer el aumento de ERO y como consecuencia EOx (Soto, 2015 en prensa).

Los resultados del FRAP en donde el GSH participa muestran que en el grupo con LDS disminuyó, lo cual confirma la presencia de EOx en el tejido aórtico. Así mismo, la LPO mostró tendencia a aumentar en el grupo con LDS, esto indica la oxidación de lípidos de la membrana celular, al mismo tiempo que aumenta la oxidación de ácidos grasos polinsaturados, se incrementa la producción de compuestos prooxidantes como el 4-

hidroxinonenal y el malondialdehído, derivados de esta oxidación, los cuales potencializan el EOX (Marotte, 2013). Sin embargo, la tendencia entre grupos podría llegar a ser significativa si se aumentara el número de muestra.

Por otra parte, los resultados de la eNOS mostrarán una tendencia a disminuir sin presentar diferencia significativa en los pacientes con LDS en comparación con los sujetos C, resultados similares fueron descritos en 2015 por Soto, quien mostró que la actividad de la iNOS y eNOS presentó aumento y disminución respectivamente en el homogenado de aortas de pacientes con SM, sugiriendo que la producción de NO basal en estos pacientes proviene de la vía de iNOS y en menor medida de la eNOS, lo que contribuye a la formación del aneurisma, además de la supresión parcial de la vía de la eNOS. Por otro lado, en modelos animales de SM se ha descrito sobreproducción de  $O_2^-$  por parte de NADPH oxidasa, xantina oxidasa y el aumento en la producción de NO por parte de la iNOS en procesos inflamatorios (Soto, 2015), lo cual promueve la formación de ONOO<sup>-</sup>, la acumulación de esta ERO aumenta el daño oxidativo (Chirino, 2006). Además, las altas concentraciones de ONOO<sup>-</sup> pueden favorecer la apoptosis en células endoteliales y la activación de metaloproteasas de la matriz (MMP) 1 y 2 en las células musculares lisas vasculares, esto promueve la degradación de los diversos componentes de la matriz extracelular tales como la colágena y la elastina (Shen, 2015).

En cuanto a los resultados de los cortes histológicos hechos en los segmentos aórticos de pacientes con LDS estos mostraron necrosis quística, con acumulación de material amorfo, esto sugiere el aumento de la concentración de ERO que participa en la fibrólisis apoptótica subendotelial (Circu, 2012). Además en 2009 Xiong determinó en un modelo murino la participación de las ERO en la formación del aneurisma aórtico abdominal, y la activación de las MMP 2 y 9, las cuales degradan la matriz extracelular y promueven la formación del aneurisma.

En la tinción de Weigert, los resultados mostraron fragmentación, engrosamiento y menor número de las fibras elásticas en el grupo LDS esto se podría relacionar con la rigidez aórtica. Se ha reportado que la fragmentación de fibras elásticas de la aorta es relacionada con la interacción entre ERO, MMP y la desregulación del TGF- $\beta$  (Wheeler, 2014). Además, se sabe que la señalización de TGF- $\beta$  contribuye a procesos fisiológicos y también como modulador de las proteínas que participan en la estructura y composición de la matriz extracelular, como la colágena. En nuestros resultados se logró observar en

las fotomicrografías el aumento de colágena, esto se describe en SM (Maleszewski, 2009). Sin embargo, es más pronunciado en el LDS, probablemente esto se debe a la desregulación en la señalización del TGF- $\beta$  que promueve mayor síntesis de colágena lo que conduce a la progresión rápida en la formación del aneurisma.

## **CONCLUSIONES**

En los pacientes con LDS, el daño estructural del aneurisma aórtico torácico ocasiona disfunción endotelial, que conduce al incremento en la actividad de las enzimas SOD Cu-Zn y -Mn. Esto aumenta la formación de ERO, las cuales no son eliminadas, ya que la actividad de la CAT y GPx están disminuidas, lo que favorece que el índice GSH/GSSG disminuya, limitando la actividad de la GPx y GST que utilizan al GSH como sustrato.

El incremento de la GSSG-R no restablece la concentración del GSH lo que se refleja en la disminución de la capacidad antioxidante total y el aumento de la LPO que favorece a las ERO.

## **LIMITACIONES**

La principal limitación de este estudio fue la obtención de los fragmentos de aorta de pacientes con LDS ya que como se ha descrito es una variante de SM con incidencia desconocida. En un lapso de cinco años aproximadamente solo se logró obtener las muestras de cinco pacientes.

## REFERENCIAS

- Aalberts JJJ, Van Den Berg MP, Bergman J, Du Marchie GJ, Post JG, Van Unen H, Pals G, Boonatra PW, Van Tintelen JP. 2008. The many faces of aggressive aortic pathology: Loeys-Dietz syndrome. *Neth Heart Jour* 16(9): 299-304.
- Avello M, Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 494(II): 161-172.
- Aviña F, Hernández A. 2011. Síndrome con hábitos marfanoides. *Rev Mex Ped*, 78(6): 236-241.
- Boileau C, Guo Dong, Hanna N, Regalado E, Detain D, Gong L, Varret M, Prakash S, Li A, d'Indy H, Braverman A, Grandchamp B, Kwartler C, Gouya L, Lyn R, Santos-Cortez P, Abifadel M, Leal S, Muti C, Shendure J, Gross M, Rieder M, Vahanian A, Nickerson D, Michel JB, Jondeau G, and Milewicz D. 2014. *TGF $\beta$ 2* Loss of function mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections associated with mild systemic features of the Marfan syndrome. *Nat Genet.* 44(8): 916-921.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 (72): 248-254.
- Cai H, Harrison DG. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000(87): 840-844.
- Cardenas-Rodriguez N, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri. 2008. Glutación peroxidasa: una familia de enzimas. Radicales libres y estrés oxidativo, aplicaciones médica. Konigsberg El Manual Moderno. Cap 13 201-217.
- Ceballos R, Ramírez S, Calzada M, Olivares C. 2006. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev Endo Nut* 14(4): 233-236.
- Chihuailaf R, Contreras P, Wittwer F. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Méx UNAM* 33(3): 265-283.
- Chirino YI, Orozco IM, Pedraza Ch. 2006. Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Rev de Inv Clin* 58(4): 350-358.
- Cisneros R, Oré R, Arnao I, Suárez S. 2011. Relación de glutación reducido/oxidado (gsh/gssg) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). *An Fac Med* 72(2): 107-111.
- Cota-Magaña I. 2014. Actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa, glutación peroxidasa, en el espermatozoide y líquido seminal

de conejo Nueva Zelanda y su relación con el sobrepeso. Tesis de Maestría UAM-I. México DF.

- Cruz J, Licea ME, Hernández P, Marcel EA, Yanes. 2011. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin* 58(1): 4-15.
- Dariush Mozaffarian. 2009. Fish, Mercury, Selenium and Cardiovascular Risk: Current Evidence and Unanswered Questions. *Int J Environ Res Public Health* 2009(6): 1894-1916.
- De León O, García G. 2008. Síndrome de Loeys Dietz. Presentación de una familia. *Rev Cub Genet Comunit* 2(3): 61-64.
- Delgado O, Betanzos C, Sumaya M. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Invest y Cien, UAA, México* 1(50): 10-15.
- Deponte M. 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione- dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3217-3266.
- Dröge Wulf. 2002. Free Radicals in the Physiological Control and Cell Function. *Am Physiol Soc.* 82(1): 47-95.
- Echeverri R, Mockus S, 2010. Mecanismos celulares en respuesta al estrés: sirtuinas. *Rev Fac Med* 58(3): 221-231.
- Ejiri J, Inoue N, Tsukube T, Menezane T. 2003. Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: Protective role of statin and angiotensin II type receptor blocker. *Card Res* 59(2003): 988- 996.
- Ellman G. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archi of Biochem and Bioph* 1959(82): 70-77.
- Fortoul Teresa, Castell Andrés. 2010. Histología y biología celular. 1er ed, Editorial Mc Graw Hill, China.
- Flohé L, Günzler W. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzym* 1984(105): 114-121.
- Galleguillos M, Plaza R, Kessi E, González E, Letelier E, Valdivia G, Adarmes H. 2012. Actividad glutatión s transferasa en la membrana sinovial de la articulación metacarpofalangica equina normal y alterada. *Arch Med Vet* 1(44): 179-183.
- Hayes JD, Flanagan J, Jowsey IR. Glutathione transferases. *An Rev Pharma Toxic* 45(1): 51-93.

- Hernandez García LD. 2009. Participación del estrés oxidativo en la muerte celular programada. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología UNAM. México DF.
- Hicks JJ, Torres YD, Sierra MD. 2006 Estrés oxidante conceptos y clasificación. *Rev Endo Nut* 14(4): 223-226.
- Kazzack. 2003. Manuales Departamentales. La páctica Histológica. 2da Edición. Editorial McGraw Hill. México DF.
- Kuzmik G, Sang A, Elefteriandes J. 2012. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *Jour Vasc Surg* 56(2): 561-575.
- Lee G, Luna. 1999 Histopathologic Laboratories Armed Forces. Institute of Pathology. Washington DC 20305 3ª edición. EUA.
- Lee J, Koo N, Min DB. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sc Food Saf* 1(3): 21-33.
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu LF, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, Backer J, Hellems J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, & Dietz HC. 2005. A síndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Gen* 37(3): 275-281.
- Maleszewski JJ, Miller DV, Lu J, Dietz HC, Halushka MK. 2009. Histopathologic findings in ascending aorta from individuals with Loeys-Dietz Syndrome (LDS). *Am J Surg Pathol* 33(2): 194-201.
- Martínez-Sámano, Torres-Duran, Juárez-Oropeza. 2011. El glutatión y sus asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Rev Edu Bioqui, UNAM Méx*, 30(2): 56-67.
- Martínez S. 2005. Especies reactivas de oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas de oxígeno. *Rev Cubana Farm* 39(3): 3-14.
- Martínez S M, Barrado D A, Subillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J. 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 40(1): 45-51.
- McCarrick G, Black III J, Browdin S. 2014. Loeys–Dietz syndrome: A primer for diagnosis and management. *Gen Med* 16(8): 576-587.

- Meaney E. 1999. El papel del endotelio en las enfermedades cardiovasculares. Fundación interamericana del corazón. México DF.
- Nuñez GH. 2013. Alteraciones de las enzimas que emplean el Glutati6n en el tejido a6rtico de pacientes con s6ndrome de Marfan. Tesis de especialidad. INCICH. M6xico DF.
- Peraza-Reyes L. 2008. Catalasa Cap 13 183-199. Radicales libres y estr6s oxidativo, aplicaciones m6dicas. Konigsberg FM Compiladora. El manual Moderno.
- P6rez G, P6rez A. 2000. M6todos para medir el da6o oxidativo. *Rev Cub Med Milit* 29(3): 192-198.
- P6rez T, Roque P, Hafidi M, D6az D, Ba6os G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Rad Res* 43(8): 761-771.
- Piemonte A, Pastore A, Tozzi G, Tagliacozzi D, Santorelli FM, 2001. Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur J Clin Invest* 2001(31): 1007-1011.
- Pisoschi AM, Pop A. 2015. The role of oxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur Jour Med Chem* 2015(97): 55-74.
- Quintanar E, Calder6n S. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Rev Edu Bioq UNAM* 28(3): 89-101.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants the: interplay. *BioMed Res Int* 2014(761264): 1-19.
- Ram6rez Marrero. 2012. Afectaci6n cardiovascular del s6ndrome de Marf6n, *Bubok Publishing S.L. Espa6a*
- Romero E, Figueroa M, Morales S, Rojas R. 2009. El estr6s oxidativo en la pared vascular y su potencialidad de manipulaci6n terap6utica. *Rev Cubana Invest Biom* 28(3): 112-129.
- Siwik D, Pagano PJ, Colucci WS. 2001. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblast. *Am J Physiol Cell* 280(1): 53-60.
- Soto M, Soria-Castro E, Guarner LV, Muruato OE, Hern6ndez MBI, Mart6nez HHJ, Barrag6n GR, Herrera V, P6rez-Torres I. 2014. Analysis of oxidative stress enzymes and structural and funcional proteins on human aortic tissue from aortopathies. *Oxid Med and Cell Longev*. 2014(760694): 1-13.

- Torres J, Del Valle L, Pérez I, Varela E. 2009. Participación de la sintasa del óxido nítrico (NO) inducible en la liberación de NO en un modelo de sepsis en rata. Papel de la vía guanilato ciclasa. *Rev Mex Cien farma* 40(4): 12-21.
- Vargas-Caraveo A. 2009. Respuesta antioxidante inducida por quercetina en linfocitos humanos circundantes. Tesis de maestría, ENMH IPN.
- Vararattanavech A, Ketterman A, 2003. Multiple roles of glutathione binding- site residues of glutathione S transferase. *Protein Pept Lett* 2003(10): 441-448.
- Venereo Gutiérrez 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31(2): 126-33.
- Wellbrock J, Sheikhzadeh S, Oliveira L, Stam H. 2014. Overexpression of gremlin-1 in patients with Loeys-Dietz syndrome: Implications on pathophysiology and early disease detection. *PLoS ONE* 9(8): 1-8.
- Welsch S. 2006. Histología. 2da edición, Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina.
- Wheeler JB, Ikonomidis JS, Jones JA. 2014. Connective tissue disorders and cardiovascular complications: the indomitable role of transforming growth factor-beta signaling. *Adv Exp Med Biol.* 802(1): 107-127.
- Wilton E, Bland M, Thompson M. 2007. Matrix metalloproteinase expression in the ascending aorta and aortic valve. *Int Cardvasc Tor Surg* 7(1): 37-41.
- World Medical Association. 2002. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Nur Ethics*, 7(1): 105-109.
- Xiong W, Mactaggat J, Knispel R, Worth J. 2009. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atheros* 202(1): 128-134.
- Yang, Van Breemen, Chung. 2010. Vasomotor dysfunction in the thoracic aorta of Marfan syndrom is associated with accumulation of oxidative stress. *Vasc Pharma*, 52(1-2): 37-45.
- Zorrilla García A. 2002. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed* 21(3): 178-185.
- Zuñiga M, Guarner V, Díaz C, Díaz D, Nava C, Beltran R, Pérez T. 2013. Modulation of oxidative stress in fatty liver of rat with metabolic syndrome by *hibiscus sabdariffa*. *Inmuno Endoc Metab Agents Med Chem* 13(3): 196-205.