

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS:

**EL PAPEL PROTECTOR DE LOS CARBOHIDRATOS CONTRA LOS
RADICALES LIBRES DE OXIGENO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Rodrigo Antonio Díaz Ruiz

MÉXICO, D.F.

2004



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: Homero Hernández Montes
Vocal: María de los Ángeles Martínez Olmedo
Secretario: Salvador Uribe Carvajal
1er. Suplente: Ruth Edith Martín Fuentes
2º. Suplente: José Pedraza Chaverri

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Asesor

Dr. Salvador Uribe Carvajal

Sustentante

Rodrigo Antonio Díaz Ruiz

A mis padres Rosa María y José Antonio, a mi hermana Emma,
a mis abuelos Guadalupe y Jorge Ruiz, y a la familia Ruiz.
por todo su cariño y apoyo.

Al Dr. Salvador Uribe por su asesoría y constante apoyo

Al Dr. Homero Hernández por sus enseñanzas

A Raquel, Iván, Sofía, Felipe, Brenda, Nadine, Mario, Carlos, Ricardo,
Gamaliel, Erika, Susana, Rosaura y Maribel por su amistad.

INDICE

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
2.1 El estrés oxidativo.....	7
2.1.1 Las especies reactivas del oxígeno y la célula.....	7
2.1.2 Defensas antioxidantes en la célula.....	8
2.1.3 El estrés oxidativo.....	10
2.2 Radicales libres.....	12
2.2.1 Generalidades.....	12
2.2.2 Las especies reactivas del oxígeno.....	12
2.2.3 El papel de los metales de transición.....	14
2.2.4 Captación y almacenamiento de hierro en las células.....	15
2.2.5 Captación y almacenamiento de cobre en las células.....	16
2.3 Efectos de los radicales libres sobre las macromoléculas.....	16
2.3.1 Efecto sobre los ácidos nucleicos	16
2.3.2 Efecto sobre los lípidos.....	17
2.3.3 Efecto sobre las proteínas.....	18
2.4 Solutos compatibles.....	19
2.4.1 Naturaleza y función de los solutos compatibles.....	19
2.4.2 Solutos compatibles como protectores contra el estrés.....	19
2.5 Trehalosa.....	20
2.5.1 Metabolismo de la trehalosa.....	20
2.5.2 La trehalosa y el estrés oxidativo.....	21
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos particulares.....	24
5. Materiales y Métodos.....	25
5.1 Materiales.....	25
5.2 Métodos.....	25
5.2.1 Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno.....	25
5.2.2 Fragmentación de la BSA mediada por radicales hidroxilo.....	26
5.2.3 Obtención del patrón de fragmentación proteica.....	27
5.2.4 Densitometría.....	28

5.2.5 Apagamiento de la fluorescencia de la BCECF mediado por el radical hidroxilo.....	28
5.2.6 Medición del efecto de los carbohidratos y polialcoholes sobre el apagamiento de la fluorescencia	30
5.2.7 Análisis de la cinética de apagamiento de la BCECF.....	30
6. Resultados.....	32
6.1 Fragmentación de la BSA por el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Protección por carbohidratos.....	32
6.2 Apagamiento de la fluorescencia de la BCECF mediado por el radical hidroxilo.....	36
6.3 El apagamiento de la fluorescencia de la BCECF es dependiente de la concentración de H_2O_2	38
6.4 Comparación entre los efectos protectores de diferentes carbohidratos y un polialcohol empleando la BCECF como indicador.....	43
6.5 Perfil de apagamiento de la BCECF en presencia de trehalosa y rafinosa.....	46
6.6 Capacidad protectora de isómeros del manitol y la galactosa.....	49
7. Discusión.....	53
8. Conclusiones.....	60
9. Apéndice: Abreviaturas.....	61
9. Referencias.....	62

1. RESUMEN

El papel protector de los carbohidratos contra los radicales libres de oxígeno

El estrés oxidativo es una condición que se puede presentar en los organismos aerobios debido a una pérdida en el equilibrio entre las condiciones oxidantes y antioxidantes. Durante el estrés oxidativo las macromoléculas biológicas pueden sufrir daños, lo cual puede tener consecuencias para la viabilidad celular.

Se ha observado que los microorganismos sometidos a estrés acumulan solutos, llamados compatibles debido a que éstos no interfieren con la actividad celular. En *Sacharomyces cerevisiae* se acumula el disacárido trehalosa como respuesta a condiciones de estrés oxidativo, alcanzando una concentración citoplásmica de hasta 600 mM.

Se evaluó la capacidad de polialcoholes y carbohidratos para proteger a la Albúmina del suero bovino (BSA) contra la fragmentación causada por los radicales hidroxilo. Los radicales OH· fueron generados a través del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. A altas concentraciones de carbohidratos, similares a las que se alcanzan fisiológicamente, se evitó la fragmentación de la BSA. Presentaron mejor efecto protector los solutos que no poseen un extremo reductor.

Se caracterizó el efecto antioxidante de estos solutos mediante el empleo de una molécula fluorescente (BCECF) que se apaga conforme se oxida. La protección de la fluorescencia fue dependiente de la concentración y del tipo de protector empleado, siendo el orden de efectividad: trisacárido > disacárido > polialcohol > monosacárido. Estos resultados pueden ayudar a explicar porqué los carbohidratos y polialcoholes se acumulan en condiciones *in vivo* durante el estrés oxidativo.

2. INTRODUCCION

2.1 Estrés oxidativo

2.1.1 Las especies reactivas del oxígeno y la célula

El oxígeno es un elemento esencial para las formas de vida aerobias, ya que su consumo está acoplado a la producción de energía mediante la síntesis de ATP. Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa (1). El aumento en la eficiencia del metabolismo aerobio con respecto al metabolismo anaerobio es dramático. En este último, una molécula de glucosa produce dos moléculas de ATP y dos moléculas de lactato ó etanol. En contraste, en el metabolismo aerobio el piruvato continúa oxidándose hasta CO₂ y H₂O y el rendimiento por molécula de glucosa es de 36 a 38 moléculas de ATP (2). Paradójicamente, el oxígeno puede llegar a ser una especie altamente tóxica, ya que de él pueden derivar especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) (3). Las ROS dañan las macromoléculas de la célula, deteriorando su función y su estructura. Por otro lado, los radicales libres tienen un papel importante en la fisiología de la célula, ya que funcionan como señales involucradas en la regulación del tono vascular, en la transducción de señales y en la respuesta al estrés oxidativo (4).

Las ROS están presentes constantemente en la célula. En relación a esto, en células de *Escherichia coli* se ha estimado que durante la fase exponencial de crecimiento existe una concentración de H₂O₂ hasta de 20 nM, misma que es generada de manera endógena (5). Por lo tanto, se ha propuesto que los efectos dañinos que puedan ejercer las ROS provienen de fallas en las defensas de la célula o de un aumento excesivo de éstas.

Las ROS son formadas en procesos metabólicos normales. Uno de estos procesos se da en la cadena respiratoria, donde la activación del oxígeno molecular es catalizada por las

flavoproteínas involucradas en el transporte de electrones y la oxidación. A esta clase de enzimas pertenecen las deshidrogenasas, las transferasas de electrones, las oxidasas y las mono-oxigenasas (6). La producción de ROS también está involucrada en la acción del sistema inmune, puesto que en neutrófilos y macrófagos hay liberación de radicales libres durante el proceso inflamatorio (7). Todo lo anterior implica que deben de existir mecanismos que ayuden a controlar los niveles de las ROS, de tal modo que no se permita una producción excesiva de éstas dentro de la célula. Adicionalmente, se debe contar con sistemas eficientes de reparación cuando haya daño por radicales libres de oxígeno. La viabilidad de la célula en condiciones donde abunda el oxígeno depende de un balance entre las condiciones oxidantes del ambiente y la función de sus sistemas antioxidantes (8).

2.1.2 Defensas antioxidantes en la célula

Las células cuentan con una variedad de sistemas antioxidantes (Tabla 1). Entre estos están las enzimas que se encargan de metabolizar directamente a las ROS, como son: la peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (9). Esta función también la pueden cumplir factores nutricionales como la vitamina E o el ácido ascórbico, que interactúan con las ROS, funcionando como “secuestradores”. Otro sistema, de gran importancia para la célula que entra en contacto con especies tóxicas y oxidantes, es el glutatión (GSH). El GSH puede ser oxidado por radicales libres, a nivel de sus grupos sulfhidrilo para producir una forma dimerizada (GSSG). Para mantener los niveles de protección asociados con el glutatión, es necesario regenerar la forma reducida de esta molécula, ya que ésta representa su forma activa. La enzima que se encarga de dicha regeneración es la glutatión reductasa (10).

Otra clase de moléculas que protegen contra el estrés son las proteínas chaperonas o Hsp (del inglés Heat Shock Protein). Generalmente están asociadas con la termoprotección, colaborando a mantener la estructura de las proteínas. Sin embargo, también pueden actuar al momento de la exposición a condiciones oxidantes (11). Las Hsp se asocian a diversas proteínas, haciendo menos accesibles los sitios más susceptibles a la oxidación. Las Hsp también funcionan capturando proteínas que han sido modificadas oxidativamente, estabilizando la estructura parcialmente plegada, favoreciendo el proceso de reparación y re-plegamiento. Si el daño hacia la estructura proteica es irreversible, las Hsp cubren a la cadena polipeptídica para evitar la agregación con otras proteínas y promueven su hidrólisis (11).

En la célula existen diversos cationes metálicos, incluyendo al Fe^{+2} . En presencia de H_2O_2 , el Fe^{+2} cataliza la producción de radicales hidroxilo. Para prevenir tal situación existen proteínas, como la ferritina o la transferrina, que secuestran al ión ferroso cuando se encuentra en exceso (12).

Tabla 1. Mecanismos antioxidantes de la célula

Molécula	Ubicación	Mecanismo de detoxificación de ROS	Referencia
Catalasa	Mitocondria y peroxisomas	Conversión de peróxido de hidrógeno a agua $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	8

Tabla 1 (Continuación)

Superóxido dismutasa	Citoplasma, mitocondria y extracelular	Conversión de anión superóxido a peróxido de hidrógeno $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	9
Glutation peroxidasa	Citoplasma, mitocondria y membrana plasmática	Reducción de peróxidos empleando dos moléculas de glutatión. $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$	9
Glutatión reductasa	Citoplasma	Reducción de la forma dimerizada del glutatión $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow NADP^+ + 2GSH$	10
Proteínas de choque térmico (Hsp)	Retículo endoplásmico, periplasma y citoplasma	Estabilización y cobertura de la estructura proteica parcialmente plegada	11
Ferritina	Citoplasma	Almacenamiento del hierro intracelular	12
Transferrina	Extracelular	Unión y transporte de hierro al medio intracelular.	12

2.1.3 El estrés oxidativo

Por diversas causas, puede perderse el balance entre condiciones oxidantes y defensas antioxidantes, lo cual puede resultar en un aumento en la cantidad de ROS o bien, en una disminución en los sistemas antioxidantes o de reparación (13). A tal condición se le denomina estrés oxidativo. En esta situación, se presentan daños de las macromoléculas biológicas debidos al rompimiento o modificación de su estructura, trayendo como consecuencia una alteración en la función o incluso, la muerte de la célula (14).

El estrés oxidativo ha sido asociado a una amplia diversidad de estados patológicos. como la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide, la cataratogénesis, la

carcinogénesis y los daños causados por la isquemia-reperfusión. También se ha relacionado esta condición con el proceso de envejecimiento (15).

El estudio del estrés oxidativo ha cobrado considerable importancia debido a las consecuencias que puede tener en la salud. También se ha observado que diversos factores ambientales, como los contaminantes en el aire y la radiación ionizante, pueden favorecer el desbalance oxidante/antioxidante (16). En la clínica se han desarrollado diversos métodos para evaluar las condiciones de estrés oxidativo, basados en la acumulación de productos oxidados y en la medición de la capacidad antioxidante de los mecanismos celulares (17).

Tabla 2. Métodos para medir el estrés oxidativo

Determinación	Fundamento
Niveles plasmáticos de malonildialdehído.	El malonildialdehído es formado como producto de la lipoperoxidación. A través de su reacción con el ácido tiobarbitúrico se forma un derivado cuantificable por colorimetría.
Alcanos exhalados	La oxidación de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas dan como productos alcanos como el etano, el propano y el pentano.
Capacidad antioxidante del plasma.	Se añade una cantidad de un oxidante y de dieno conjugado al plasma, para formar un aducto entre el dieno y el lipoperóxido resultante. Por espectrofotometría se sigue la cinética de formación del producto. El tiempo que tarda en aparecer el aducto es proporcional a la capacidad antioxidante del plasma.
Grupos carbonilo en el plasma.	Se cuantifican por colorimetría, a través del producto de reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los grupos carbonilo generados por oxidación de biomoléculas.

Tomado y modificado de la referencia 17

2.2 Radicales libres

2.2.1 Generalidades.

Un radical libre es una especie que contiene un electrón no apareado y es de alta reactividad, ya que tiende a atrapar electrones del medio donde se haya producido o de otras especies ricas en electrones (18). Los radicales libres importantes en biología provienen de centros que contienen átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre.

El oxígeno es una molécula bi-radical estable, y tiene la particularidad de poseer dos electrones no apareados en dos orbitales π de antienlace diferentes (Fig. 1). Debido a esto, puede participar en procesos de transferencia de un solo electrón. Sin embargo, el potencial de reducción para el oxígeno es muy bajo ($E^0 = -0.16$ V), lo cual indica que no es un buen aceptor de electrones (19). La baja reactividad del oxígeno es de vital importancia, ya que de lo contrario, todas las moléculas esenciales para la vida serían oxidadas.

Para lograr la transferencia univalente de electrones se requieren condiciones especiales, como por ejemplo, la presencia de metales de transición o de moléculas orgánicas ricas en electrones, o bien la presencia de radiación ionizante (19). Las principales especies reactivas a las que da origen el oxígeno son cuatro: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singulete (Fig. 1) y el radical hidroxilo (3).

2.2.2 Las especies reactivas del oxígeno (ROS)

El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son formados por la transferencia de uno y dos electrones, respectivamente, a la molécula de oxígeno. Los potenciales de reducción para estas dos especies son más altos que para el oxígeno (0.94 V y 0.38 V,

respectivamente) (20), siendo mejores aceptores de electrones que éste, y por lo tanto, más reactivos. A pesar de este aumento de reactividad, en condiciones celulares normales estas dos especies no producen daños considerables. Esto es debido, principalmente, a los mecanismos antioxidantes mencionados anteriormente. No obstante, deben considerarse ciertos factores estructurales de estas especies para explicar algunas de sus propiedades.

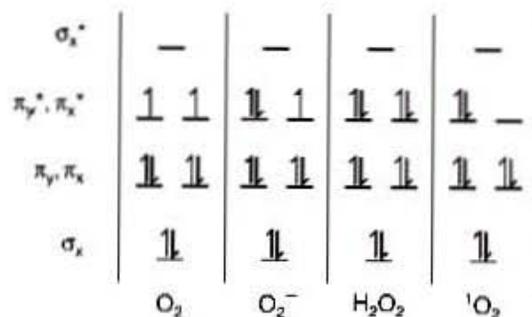


Figura 1. Diagrama de los orbitales moleculares del Oxígeno y las ROS derivadas de éste. De izquierda a derecha: Se muestra el carácter biradical del oxígeno molecular (O_2) debido a la presencia de electrones desapareados en sus orbitales π de antienlace. En el radical superóxido (O_2^-) sólo uno de estos electrones está desapareado, constituyendo un radical libre. En el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ambos electrones del oxígeno han sido apareados. Finalmente, en el oxígeno singulete (1O_2) uno de los electrones de antienlace del oxígeno se aparea con el otro, dejando un orbital π de antienlace vacío.

El anión superóxido, posee una carga negativa y debido a esto su interacción con moléculas ricas en electrones no es favorable. Por lo tanto, las macromoléculas biológicas con alta densidad electrónica son poco sensibles al radical superóxido. El peróxido de hidrógeno es inestable debido al enlace entre oxígenos que existe en su estructura. El oxígeno singulete es considerado sólo en sistemas fotosintéticos, pues su formación está

dada por la transferencia de la energía proveniente de cromóforos fotoexcitados (21). La especie más reactiva es el radical hidroxilo, el cual reacciona virtualmente con cualquier molécula con la que tenga contacto; sin embargo, un factor limitante en su acción es su incapacidad para difundir, precisamente por su alta reactividad (22).

2.2.3 El papel de los metales de transición

Como se ha señalado, la producción de ROS es acelerada en presencia de metales como el cobre o el hierro (23). Ambos metales en presencia de peróxido de hidrógeno favorecen la generación de radicales hidroxilo. Una de las principales vías de producción de ROS es la reacción de Fenton (Figura 2, Reacción 1), en donde el catión en su estado reducido (Cu^{1+} ó Fe^{2+}), funciona como donador de un electrón en un proceso llamado “ciclo de Haber-Wiess” (24) (Figura 2), en el cual la especie metálica es regenerada, cumpliendo así la función de catalizador.

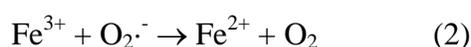
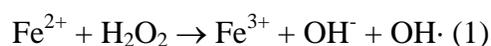


Figura 2. Esquema del ciclo de Haber-Weiss. El catión ferroso funciona como agente reductor al donar un electrón al peróxido de hidrógeno para formar un ión hidróxido y un radical hidroxilo. En el siguiente paso, el ión férrico recupera un electrón del superóxido para producir oxígeno y regenerar el ión ferroso.

De la misma manera, el catión en su estado oxidado puede favorecer la producción de radicales hidroxilo en una reacción tipo Fenton. El mecanismo de esta reacción todavía no

es conocido. Sin embargo, se ha determinado experimentalmente la presencia del radical hidroxilo generado a través de dicho sistema (25). Ambos metales generan radicales libres por cualquiera de las dos vías antes mencionadas (26). El hierro y el cobre son empleados para el estudio de los fenómenos asociados al estrés oxidativo en estudios *in vitro*. Ambos tienen importancia fisiológica, pues constituyen la vía principal por la cual se generan radicales libres a través de la reacción Fenton en sistemas biológicos.

2.2.4 Captación y almacenamiento de hierro en las células.

En el metabolismo celular normal el hierro tiene un papel vital, ya que éste es incorporado en grupos prostéticos de proteínas que participan en reacciones de oxidoreducción y en mecanismos de protección contra radicales libres. Debido a la gran necesidad del organismo por este metal, existe un flujo constante de hierro hacia la célula que lo capta y almacena (27). La transferrina es una proteína encargada de capturar al ión férrico del medio extracelular y llevarlo a un receptor donde se transporta al citoplasma (11). También se ha encontrado un transportador de protones acoplado al transporte inespecífico de cationes divalentes llamado DMT1 (por sus siglas en inglés Divalent Metal Transporter 1). Este se encuentra en la porción apical de las células epiteliales del intestino delgado proximal. El DMT1 posee 12 dominios transmembranales y un sitio involucrado en el transporte de hierro (28). Existen pozas intracelulares de hierro, siendo la ferritina una de las principales. La ferritina es capaz de almacenar hasta 4500 Fe^{3+} por molécula (27).

Cuando existe una sobrecarga de hierro, o bien, cuando existe alguna falla en alguno de estos sistemas, se provoca un incremento en la concentración de hierro libre. El hierro libre es conocido como “hierro lábil”, debido a que ésta es la fracción del hierro total de la célula que puede participar en el ciclo de Haber Weiss y generar estrés oxidativo (27). Se han

determinado los niveles de hierro lábil en hepatocitos y células endoteliales de hígado de rata, y se ha encontrado que varían dentro del rango de 5-20 μM . La concentración es diferente para cada organelo, y depende de la necesidad de hierro por parte de estos (29).

2.2.5 Captación y almacenamiento de cobre en las células

El cobre es un elemento traza en la célula, necesario para la síntesis de enzimas como la superóxido dismutasa y la citocromo c oxidasa mitocondrial (30). La absorción y el transporte del cobre hacia el hígado ocurre a través de proteínas plasmáticas como la albúmina, la transcupreína y la ceruloplasmina (31). En el hígado, el cobre puede ser empleado para la síntesis de proteínas o almacenado unido a la proteína citoplásmica metalotioneína. Los depósitos de cobre se encuentran principalmente en el hígado. El transporte de este metal y su reabsorción depende de su unión con ácidos orgánicos y aminoácidos (32). La toxicidad y daño oxidativo por cobre resulta de la exposición a un exceso de éste por riesgo ocupacional o por su presencia como contaminante ambiental (33).

2.3. Efectos de los radicales libres sobre las macromoléculas

2.3.1 Efecto sobre los ácidos nucleicos

Los radicales libres dañan al DNA al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El daño oxidativo al DNA es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que resultan en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y aún enfermedades hereditarias. En relación a esto, se han detectado más de 20

tipos de modificaciones estructurales de las bases. Se ha observado que en presencia de las ROS existe fragmentación del DNA y aparecen fragmentos internucleosomales (34).

Existen mecanismos de reparación del DNA, que se activan en el momento en que éste sufre modificaciones oxidativas. Cuando las especies reactivas alcanzan al núcleo o se generan dentro de éste por reacción de Fenton, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, y que continuamente monitorean y reparan el daño causado. Se ha reportado que el mecanismo de reparación por escisión de bases es el más importante en el caso de la modificación oxidativa (35). Este mecanismo se caracteriza por la remoción de la base modificada por una enzima glucosilasa, dejando un sitio sin base (sitio AP), el cual es removido por una endonucleasa y el segmento es reemplazado por la acción de la DNA polimerasa I y la ligasa. Cuando la modificación afecta regiones más extensas del DNA, el sistema de reparación por escisión de nucleótidos es el que actúa, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser reemplazado por la DNA polimerasa I y la ligasa (36).

2.3.2 Efecto sobre los lípidos

El efecto principal de los radicales libres sobre los lípidos es la reacción de lipoperoxidación. El contacto de los lípidos de la membrana con un agente oxidante, como puede ser cualquiera de las ROS, genera lipoperoxidación (9). En esta reacción, el radical libre formado oxida una cadena insaturada del lípido, dando la formación de un lípido hidroperóxido y un radical alquilo. El alquilo reacciona con una molécula de oxígeno y genera la especie inicial, constituyendo una reacción cíclica. Esta lipoperoxidación trae como consecuencia una alteración en la estructura de la membrana, afectando su fluidez y provocando daño en su integridad. La peroxidación de los lípidos genera especies como el

malonildialdehído y el 4-hidroxi-3-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos que pueden interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas (37) y DNA (38). La lipoperoxidación es un proceso involucrado en enfermedades cardiovasculares, particularmente en la aterogénesis. Un proceso importante es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, efecto que ha sido relacionado con la aterosclerosis (39).

2.3.3 Efecto sobre las proteínas

Uno de los aspectos más críticos del estrés oxidativo es el daño causado a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o la interrupción en la regulación de las vías metabólicas (14). A diferencia de los ácidos nucleicos, los sistemas de reparación de las proteínas sólo se limitan a los residuos de metionina (40), de modo que las proteínas oxidadas tienen que ser hidrolizadas para evitar una disfunción en la red metabólica o para evitar interacciones inespecíficas con otras proteínas.

Los efectos de los radicales libres sobre la proteína son: la oxidación de residuos de aminoácido, el rompimiento del enlace peptídico, y la agregación entre proteínas. En el caso de las proteínas es importante considerar a la reacción de Fenton, pues en presencia de concentraciones fisiológicas de Fe (II), un aumento de H₂O₂, favorece la oxidación en los sitios de las proteínas involucrados en la unión a metales (41). Una amplia diversidad de enfermedades han sido directamente vinculadas con la presencia de las proteínas oxidadas, algunas de esas son: la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide y la cataratogénesis (14).

2.4 Solutos compatibles

2.4.1 Naturaleza y función de los solutos compatibles.

Cuando están sometidas a condiciones de estrés, las bacterias, las arqueobacterias y las levaduras sintetizan o toman del medio determinados solutos que se acumulan alcanzando una alta concentración en el citoplasma, llegando incluso, al orden de magnitud molar (42). A éstos, se les ha denominado “solutos compatibles”, debido a que no interfieren con la actividad metabólica y los procesos vitales para la célula.

Durante un tiempo se mantuvo la hipótesis de que el único propósito de este proceso era contrarrestar los cambios en la osmolaridad del medio. Sin embargo, se ha demostrado que además de la función osmótica, los solutos compatibles pueden tener un efecto protector, manteniendo la integridad de los organelos y el funcionamiento de las enzimas. Los solutos compatibles son esenciales para la supervivencia cuando la célula es expuesta a condiciones adversas. Las características estructurales de estos solutos pueden ser de dos tipos: a) aminoácidos o derivados de éstos y b) derivados de carbohidratos o polialcoholes (43). La naturaleza del soluto acumulado depende del microorganismo, de las condiciones de estrés a las cuales sea sometido y de la fase de crecimiento en la que se encuentre (44). Los solutos compatibles se acumulan en diversas condiciones, como la desecación, las temperaturas extremas y el estrés oxidante (42).

2.4.2 Solutos compatibles como protectores contra el estrés.

Tomando como base la actividad protectora de los solutos compatibles, se han encontrado diversas aplicaciones prácticas *in vitro*. A continuación se mencionan algunas de éstas: La glicina betaína, un derivado de aminoácido, es acumulado como soluto compatible en plantas, algas, bacterias y algunos hongos. Ha sido empleada como

termoprotector en cultivos de *Bacillus subtilis* (45). La ectoína, también un derivado de aminoácido acumulado en hongos, ha sido empleada como protector contra la oxidación inducida por el sistema Fenton (46). El manitol, que es un polialcohol almacenado por algas, se ha empleado como secuestrador de radicales hidroxilo (47).

Uno de los solutos compatibles que ha recibido más atención es el disacárido trehalosa. Este es encontrado en una amplia diversidad de organismos como bacterias, hongos, insectos, plantas y mamíferos. Su importancia yace en su capacidad protectora contra diferentes tipos de estrés (48). Se ha demostrado su actividad crioprotectora y termoprotectora en una forma dependiente de la concentración, al estabilizar la estructura y actividad de la H⁺-ATPasa aislada de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis* durante condiciones de liofilización-rehidratación y estrés térmico (49, 50).

2.5. Trehalosa.

2.5.1. Metabolismo de la trehalosa

En levaduras como *Saccharomyces sp*, *Kluyveromyces sp* y *Candida sp*, se acumula trehalosa como soluto compatible. La trehalosa (1,1'- α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado a partir de dos unidades de glucosa unidas por un enlace glucosídico α (1 \rightarrow 1). En estos microorganismos, la trehalosa es sintetizada por un complejo enzimático localizado en el citoplasma. El complejo de la trehalosa sintasa está constituido por tres componentes: Tps1p (Trehalosa 6-fosfato sintasa) que sintetiza trehalosa 6-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato y UDP-glucosa; Tps2p (Trehalosa 6-fosfato fosfatasa) que hidroliza el enlace éster fosfato, para dar trehalosa y fosfato libre; y el tercer componente (Tsl1p) que probablemente sea una subunidad reguladora. El catabolismo de la trehalosa es llevado a cabo por la enzima trehalasa, de la

cual existen dos isoformas con pH óptimo diferente: la trehalasa neutra, que es una enzima citoplásmica (pH óptimo de 7.0) y la trehalasa ácida que está presente en vesículas endocíticas (pH óptimo 4.5) (51).

Anteriormente, se había propuesto que este carbohidrato tenía una función de reserva. Esta opción se ha descartado porque durante la fase de crecimiento exponencial, condición en la cual la glucosa es abundante, no hay síntesis de trehalosa sino de glucógeno, el cual es el principal compuesto de reserva en la célula. De manera contrastante, la trehalosa es sintetizada en la fase estacionaria, cuando la glucosa extracelular es escasa (52). De hecho, cuando se prolonga esta fase, la trehalosa es metabolizada solamente después de que se acaba el glucógeno (53).

En la levadura, la trehalosa protege contra el estrés. Su síntesis es inducida como parte de una respuesta adaptativa a condiciones como choque térmico, deshidratación y oxidación (48). La concentración de trehalosa acumulada en levaduras sometidas a estrés es de 0.5-0.6 M (50).

2.5.2 La trehalosa y el estrés oxidativo.

El papel protector de la trehalosa durante las condiciones de choque térmico ha sido comprobado *in vivo* (54). Sin embargo, su contribución a la protección contra el estrés oxidativo ha sido objeto de discusión. Se ha reportado que en *S. cerevisiae* existe una respuesta adaptativa al estrés oxidativo independiente de los niveles de trehalosa presentes en el medio (55). Para este mismo microorganismo, se reportó que la expresión del gen TPS1 que codifica para la trehalosa 6-fosfato sintasa no tiene un papel esencial en la tolerancia a la presencia de estrés oxidativo resultante de la presencia de peróxido de hidrógeno (56). Sin embargo, se ha propuesto que la trehalosa protege la viabilidad de las

células de *Saccharomyces cerevisiae* contra los efectos de los radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton, y esto se reflejó en la protección de proteínas plasmáticas (57).

En este trabajo se decidió evaluar si algunos carbohidratos y polialcoholes pueden funcionar como protectores contra la oxidación mediada por el radical hidroxilo. De esta manera se podría explicar porqué la célula “per se” acumula manitol y la trehalosa durante condiciones de estrés oxidativo.

2. HIPOTESIS

La presencia de carbohidratos o polialcoholes en el medio evitará la oxidación de una proteína mediada por el radical hidroxilo ó el apagamiento de la fluorescencia de una molécula indicadora sensible.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Demostrar el papel protector de los carbohidratos y los poliacoholes de proteínas contra la oxidación mediada por el radical hidroxilo.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del radical hidroxilo derivado del sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sobre la integridad estructural de la albúmina sérica bovina.
- Medir el efecto protector de carbohidratos y polialcoholes contra la proteólisis mediada por el radical hidroxilo.
- Determinar el efecto antioxidante de carbohidratos y polialcoholes empleando un sistema fluorescente como modelo.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Materiales

El fosfato dibásico de potasio, el sulfato cúprico, el ácido clorhídrico y el metanol fueron adquiridos de J.T.Baker S.A. de C.V. (México). El ácido acético y el ácido tricloroacético (TCA) fueron adquiridos de Merck-México S.A. El peróxido de hidrógeno, el manitol, el sorbitol, la glucosa, la galactosa, la sacarosa, la trehalosa, la rafinosa y la albúmina del suero bovino (BSA) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La BCECF (2',7'-Bis-Carboxietil-5(6)-Carboxifluoresceína) se adquirió de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). El Tris (Hidroxietyl Aminometano), la acrilamida, la bis-acrilamida, el dodecil sulfato de sodio (SDS), el persulfato de Amonio, el TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina), el azul de bromofenol, y el Coomassie fueron adquiridos de Bio-Rad (Richmond, CA).

5.2 Métodos.

5.2.1 Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno

La determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno se realizó por método espectrofotométrico. La solución de peróxido de hidrógeno se preparó tomando una alícuota de 100 μL del patrón de peróxido de hidrógeno 30 % y llevando a un volumen de 100 mL con agua desionizada en un matraz aforado. Se determinó la absorbancia de esta dilución contra un blanco de agua desionizada, empleando una longitud de onda de 240 nm y un coeficiente de extinción molar de $35.76 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (58). Esta determinación se realizó antes de cada experimento para tomar en cuenta los cambios de concentración debidos a la descomposición del reactivo.

5.2.2 Fragmentación de la Albúmina del suero bovino (BSA) mediada por radicales hidroxilo.

Esta determinación se realizó la incubando la albúmina en presencia de un sistema generador de radicales hidroxilo. Se retiraron alícuotas de esta mezcla cada 3 minutos. El efecto oxidante se determinó por electroforésis.

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 300 µg de BSA y sulfato de cobre 0.1 mM, en un volumen total de 200 µL ajustado con solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.0. La fragmentación se inició con la adición de H₂O₂ 40 mM provenientes la solución patrón. La mezcla se incubó en un baño a 25°C. Cada tres minutos se retiró una alícuota de 20 µL, la cual se colocó en un tubo Eppendorf de 0.6 mL y se añadieron 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 30% (p/v), y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 2 minutos en una microcentrífuga para tubos Eppendorf. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 20 µL de una solución de rafinosa 0.1 M en solución amortiguadora de fosfato 100 mM, pH 7.0. El efecto protector de cada uno de los carbohidratos o polialcoholes se determinó a una concentración de 600 mM. Para cada uno de ellos se preparó una solución patrón 1 M en un amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7.0. Se tomaron muestras de la mezcla de fragmentación en los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 minutos. Las muestras obtenidas fueron guardadas en el congelador hasta su análisis por electroforésis.

5.2.3 Obtención del patrón de fragmentación proteica.

La determinación del patrón de fragmentación de la BSA se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Para preparar el gel concentrador se utilizaron: 0.4 mL de una solución de acrilamida 30% / bis-acrilamida 0.8 % (p/v), 0.75 mL de un amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 1.8 mL de agua desionizada, 30 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v), 30 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (w/v) y 5 μ L de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina). Para el gel separador se emplearon: 2.5 mL de una solución de acrilamida 30% / bis-acrilamida 0.8 % (p/v), 0.95 mL del amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 8.9, 3.9 mL de agua desionizada, 50 μ L de persulfato de amonio al 10% (p/v), 75 μ L de SDS al 10% (p/v) y 5 μ L de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina). La concentración final de poliacrilamida fue del 15%. Los geles se prepararon un día antes de usarse, manteniéndolos en una bandeja con agua destilada a temperatura ambiente.

A 20 μ L de las muestras obtenidas en la sección 5.2.2 se les añadieron 20 μ L del amortiguador de carga, constituido por Tris – HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10% (p/v), Glicerol 30% (v/v), Azul de bromofenol al 0.1%. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C. Al final de esta incubación, los 40 μ L resultantes se colocaron en sendos pozos del gel. La cantidad de proteína en cada pozo fue de aproximadamente 30 μ g.

Se corrió el gel empleando un aparato Mini-protean II. Para esto se utilizó una solución con glicina 0.192 M, Tris 0.025 M y SDS 0.1 % (p/v). Se empleó un voltaje constante de 100 mV, y se dejó correr la muestra aproximadamente durante una hora y media, hasta que el frente llegó a 2 cm del final del gel.

La tinción del gel se hizo con una solución acuosa de azul de Coomassie 0.125%, Metanol 40% y Ácido acético 10% durante 4 horas, y se destiñó con una solución acuosa de Metanol 40 % y Ácido acético 10 % durante 4 horas.

5.2.4 Densitometría

Se midió la intensidad de las bandas observadas en el patrón de fragmentación proteica en el gel de poliacrilamida por medio de densitometría. Se tomó una fotografía de cada gel y ésta se analizó con el programa Collage 2.0 (Mac) (Specular, 1995). El parámetro que se empleó para el análisis fue el número de píxeles correspondientes a cada una de las bandas.

5.2.5 Apagamiento de la fluorescencia de la BCECF mediado por el radical hidroxilo.

Se utilizó el método establecido por Naguib (59), en el cual se monitorea la velocidad del apagamiento de la fluorescencia de un indicador como consecuencia de su oxidación por radicales libres.

Para estudiar la actividad oxidante de los radicales hidroxilo generados por el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ fue necesario emplear un método sensible a especies reactivas de oxígeno. Como indicador se empleó la BCECF (2',7'-Bis-Carboxietil-5(6)-Carboxifluoresceína), (Fig. 3). La oxidación de este reactivo pierde la continuidad del sistema conjugado y trae como consecuencia la una pérdida de la fluorescencia.

Como la BCECF detecta también cambios en el pH (60), la solución se amortiguó fuertemente mediante el empleo de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.0.

Para generar el apagamiento de la BCECF se utilizó el sistema generador de radicales hidroxilo mencionado en la sección 5.2.2, para ello se colocaron en una celda de vidrio sulfato de cobre 0.1 mM y BCECF 5.62 nM en un volumen final de 2 mL de amortiguador de fosfato 100 mM pH 7.0 y la mezcla se dejó equilibrar en el aparato durante 5 minutos. Para iniciar el apagamiento se añadió H₂O₂ 40 mM.

Los carbohidratos y polialcoholes protectores fueron adicionados antes que el peróxido de hidrógeno.

El seguimiento del apagamiento se hizo en un espectrofluorómetro Mark I acoplado a un graficador de cama, empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 505 nm y 525 nm respectivamente, una apertura de ventana de 10 nm y . Durante el experimento se mantuvieron condiciones de agitación constante y temperatura ambiente.

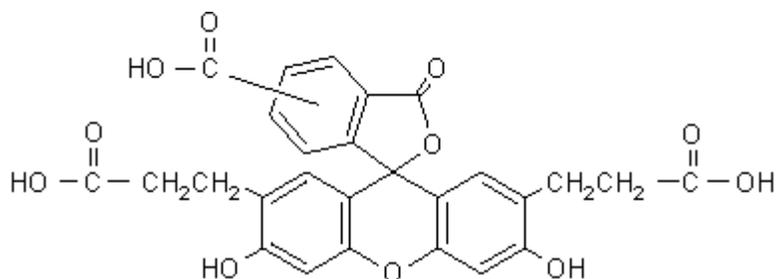


Figura 3. 2',7'-Bis-Carboxietil-5(6)-Carboxifluoresceína
(BCECF)

El espectro de emisión de la fluorescencia de la BCECF fue obtenido manteniendo fija la longitud de onda de excitación en 505 nm.

También se realizó el perfil de apagamiento de la BCECF en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (2.5, 5, 10, 20, 30 y 40 mM). El apagamiento se registró durante 50 minutos.

Para evaluar la linealidad en la respuesta del método empleado se obtuvieron las constantes de rapidez de apagamiento de la fluorescencia, ajustando los datos a una cinética de primer orden (ver la sección 5.2.7).

5.2.6 Efecto de los carbohidratos y polialcoholes sobre el apagamiento de la fluorescencia.

Para estos experimentos se emplearon los polialcoholes manitol y sorbitol y los monosacáridos glucosa y galactosa, el disacárido trehalosa y el trisacárido rafinosa. De cada uno de ellos se preparó una solución patrón 0.1 M en una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.0.

Se emplearon las mismas condiciones que en 5.2.5 con H_2O_2 40 mM. Cada uno de estos solutos se empleó en concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 mM.

Se registró el apagamiento durante los primeros 25 minutos y se obtuvieron las rapidezces iniciales de apagamiento.

Debido a que la trehalosa y rafinosa mostraron un mayor efecto protector se realizó un perfil de apagamiento de la BCECF en presencia de éstos. Para esto se emplearon las mismas concentraciones (0.1-4 mM) y el registro se realizó durante 50 minutos.

5.2.7 Análisis de la cinética de apagamiento de la BCECF.

La cinética de apagamiento de la fluorescencia se analizó empleando el programa Origin versión 6.0 (Microcal Software, Inc. 1999). Para determinar la linealidad del método

se obtuvieron las rapidezces de apagamiento ajustando los datos a una cinética de primer orden (ecuación 1), donde U son las unidades de fluorescencia, A es una constante, k es la constante de rapidez y t es el tiempo.

$$\text{Ln } U = A - kt \quad (1)$$

También se hizo un ajuste de los datos mostrados en las gráficas a una cinética decreciente exponencial de primer orden (ecuación 2) y de segundo orden (ecuación 3), donde y_0 es la fluorescencia residual, A_1 y A_2 representan la amplitud del apagamiento, k_1 la constante de rapidez de apagamiento en la primera fase, k_2 la constante de rapidez de apagamiento en la segunda fase y t es el tiempo.

$$y = y_0 + A_1 e^{-k \cdot t} \quad (2)$$

$$y = y_0 + A_1 e^{-k_1 \cdot t_1} + A_2 e^{-k_2 \cdot t_2} \quad (3)$$

6. RESULTADOS

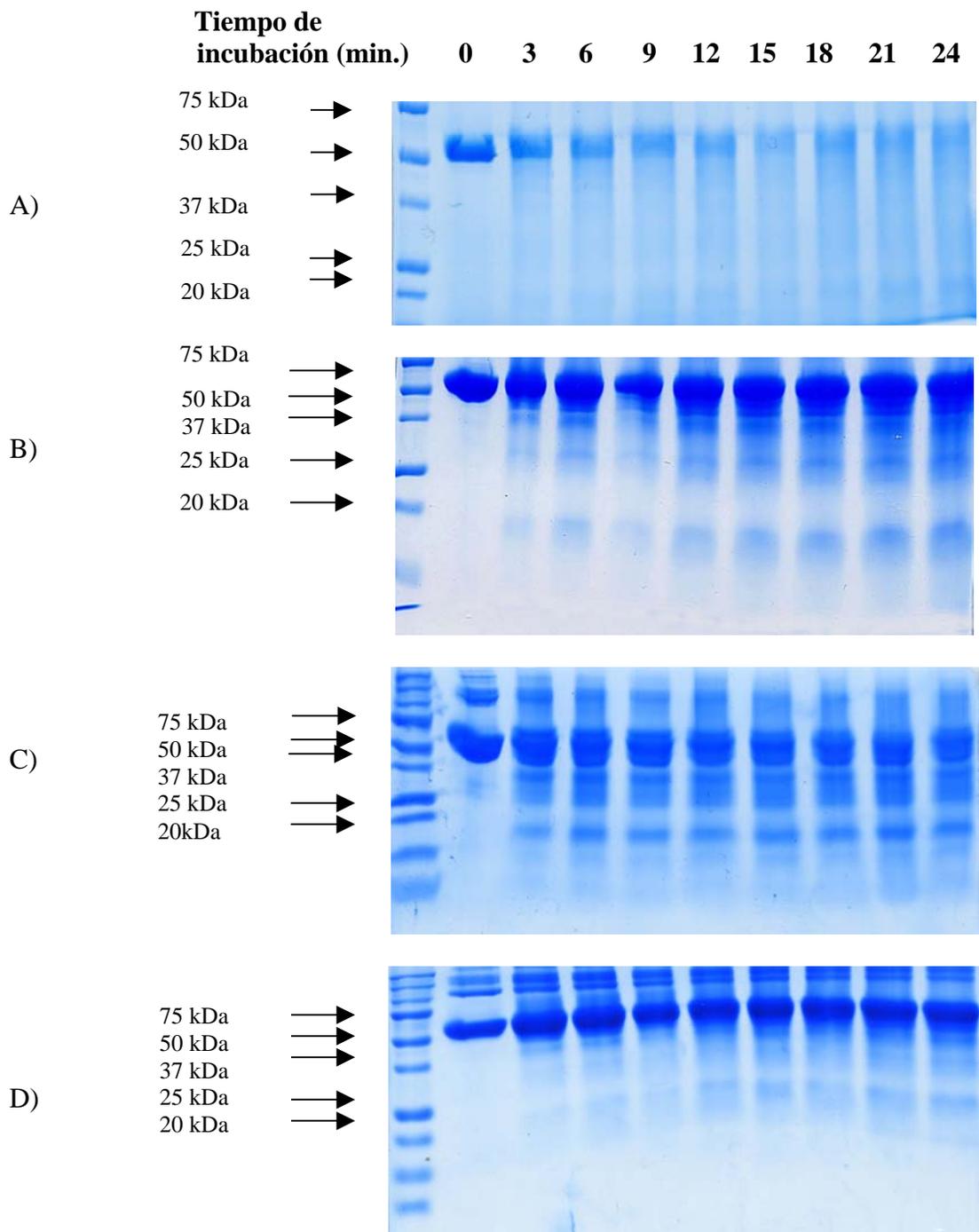
6.1 Fragmentación de la albúmina de suero bovino por el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$.

Protección por carbohidratos.

En la célula, uno de los efectos más dañinos de las especies reactivas de oxígeno es la ruptura de las proteínas (ver sec 2.3.3). Para determinar si un sistema generador de radicales hidroxilo puede generar proteólisis se expuso a la albúmina sérica bovina a los componentes de una reacción tipo Fenton. Además, este sistema pudo utilizarse para evaluar el efecto de la adición de diversos polialcoholes y carbohidratos sobre la proteólisis.

En condiciones de estrés, la concentración de trehalosa alcanza 0.6 M en el citoplasma de la levadura (54). Este disacárido es acumulado en levaduras durante el estrés oxidativo (48). Se han elaborado pruebas *in vivo* donde se demuestra que el aumento de la concentración endógena de trehalosa en *S. cerevisiae* disminuye la cantidad de proteínas oxidadas (57). Sin embargo, hasta ahora no se ha evaluado en forma directa a la trehalosa como protector contra las ROS. Por esto se realizó la fragmentación de la BSA a través de un sistema oxidante (ver secc. 5 .2.2) en presencia de trehalosa. Como referencia se utilizó al manitol que *in vitro* actúa como un protector contra radicales hidroxilo (47).

Inicialmente, este experimento se realizó empleando bajas concentraciones de trehalosa y rafinosa (20-100 mM) y los resultados obtenidos no mostraron ninguna diferencia con el control (Resultados no mostrados). Los patrones de fragmentación obtenidos en presencia de una concentración 0.6 M de cada soluto: manitol, galactosa, trehalosa ó rafinosa sí mostraron protección y se presentan a continuación (Fig. 4)



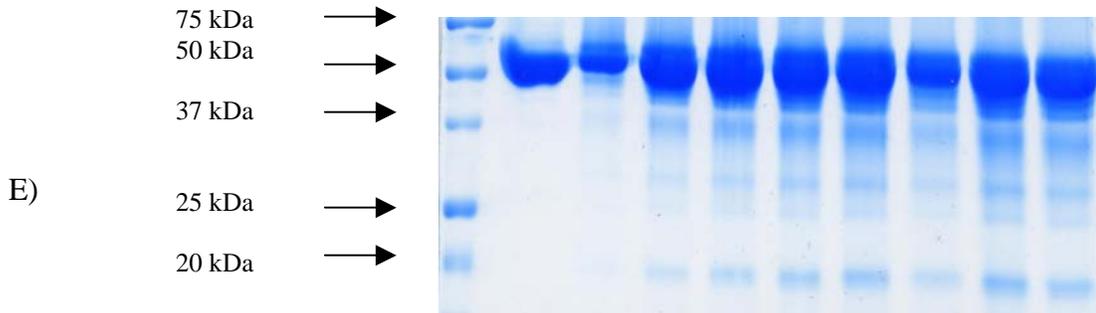


Figura 4. Patrón de fragmentación de la BSA en ausencia y presencia de diferentes carbohidratos y un polialcohol. Las condiciones experimentales fueron: BSA 1.5 mg / mL, H_2O_2 40 mM, $CuSO_4$ 0.1 mM en una solución amortiguadora de fosfatos 100mM, pH 7.0 a 25°C. Cuando se adicionó un carbohidrato ó polialcohol se usó a una concentración de 0.6 M y se colocó antes que el H_2O_2 . La mezcla se incubó en un baño de temperatura constante y se retiraron alícuotas de 20 μ L cada 3 minutos, para ser tratadas como se describe en la sección 4.2.2. El inciso A) corresponde al control sin adiciones, B) Manitol, C) Glucosa, D) Trehalosa y E) Rafinosa.

Se presentó una fragmentación de la BSA que aumentó con el tiempo de incubación (Fig. 4 A) y que se observa desde los 3 minutos. En este tiempo, la intensidad de la banda disminuyó aproximadamente en un 50% (Fig. 5). Esta banda de aproximadamente 60 kDa correspondiente a la BSA sin oxidar disminuye su intensidad conforme al tiempo. A los 24 minutos prácticamente no se observó la banda correspondiente a la BSA nativa y se detectó aproximadamente el 10% de la banda inicial.

El manitol, la glucosa, la galactosa, la trehalosa y la rafinosa en una concentración de 0.6 M lograron evitar en diferentes grados la fragmentación mediada por Cu^{2+}/H_2O_2 , además de que en presencia de éstos la intensidad de la banda se mantuvo arriba del 60% aún después de los 24 minutos de incubación (Figs. 4B-4E). El orden de protección fue:

trehalosa > manitol > glucosa > rafinosa. Cuando éstos fueron adicionados, disminuyó la rapidez de fragmentación de la BSA con respecto al control (Fig. 5).

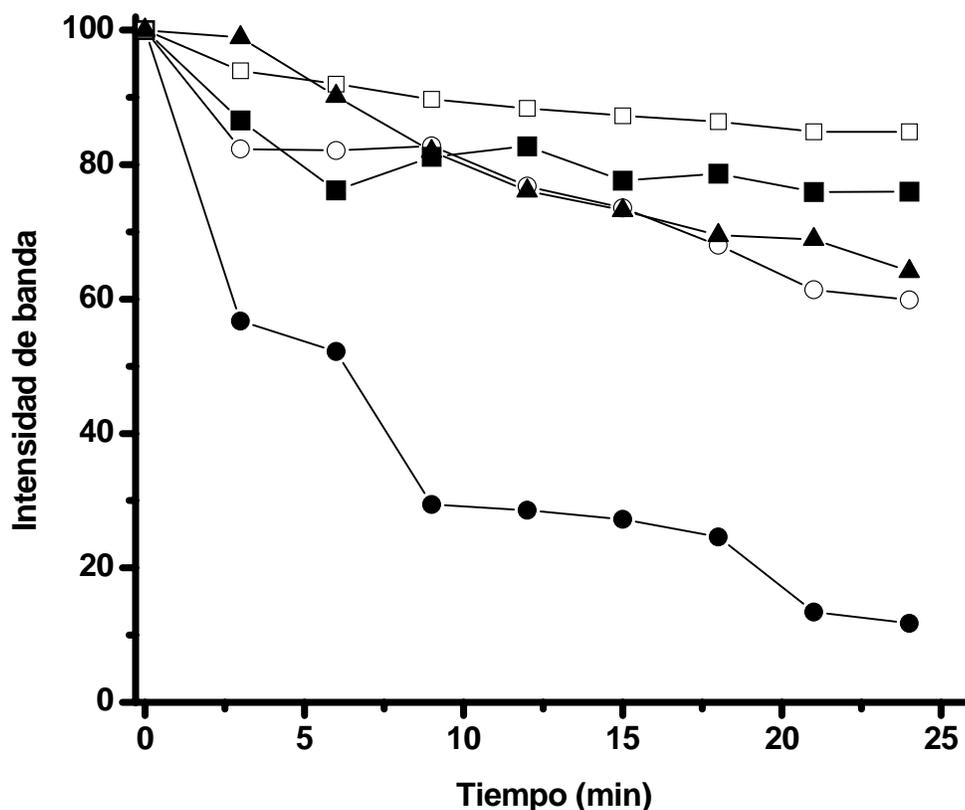


Figura 5. Disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la BSA nativa respecto al tiempo. Cada banda de los geles respectivos fueron analizadas por densitometría como se explica en la sección 5.2.4. Los solutos empleados fueron: (●) Control, (○) Glucosa, (■) Manitol, (□) Trehalosa, (▲) Rafinosa.

Se esperaba que el manitol presentara alguna protección, pues generalmente es empleado como secuestrador de radicales libres. La protección brindada por éste fue considerable (fig. 4B), manteniendo un 80% de la integridad de la banda de la BSA

durante 24 minutos en presencia de radicales hidroxilo. Un efecto similar se observó con la trehalosa que durante este mismo intervalo de tiempo preservó ~90% de la banda inicial (Fig. 4D). En ambos casos la disminución en la intensidad de la banda fue más lenta que con la glucosa y la rafinosa. Esos dos protectores comparten una característica: no poseen un extremo reductor, ya que el manitol es un polialcohol y la trehalosa es un disacárido no reductor.

El efecto protector de la glucosa (Fig. 4C y 5) y la rafinosa fue parcial (Fig. 4E y 5). En ambos casos, se observó a los 24 minutos que se conservaba aproximadamente el 60% de la banda correspondiente a la BSA. También se puede notar la aparición de pequeñas bandas correspondientes a fragmentos de 20-25 kDa, mientras que con la trehalosa este fenómeno es menos notable.

6.2 Apagamiento de la fluorescencia de la BCECF mediado por el radical hidroxilo.

Se decidió diseñar un sistema para evaluar rápida y cuantitativamente el efecto del radical hidroxilo, así como la protección ejercida por cada carbohidrato estudiado. Debido a su sensibilidad hacia los radicales libres (secc. 5.2.5) se utilizó la molécula fluorescente BCECF. Este sistema puede emplearse para evaluar el apagamiento mediado por el radical hidroxilo en presencia ó ausencia de un protector.

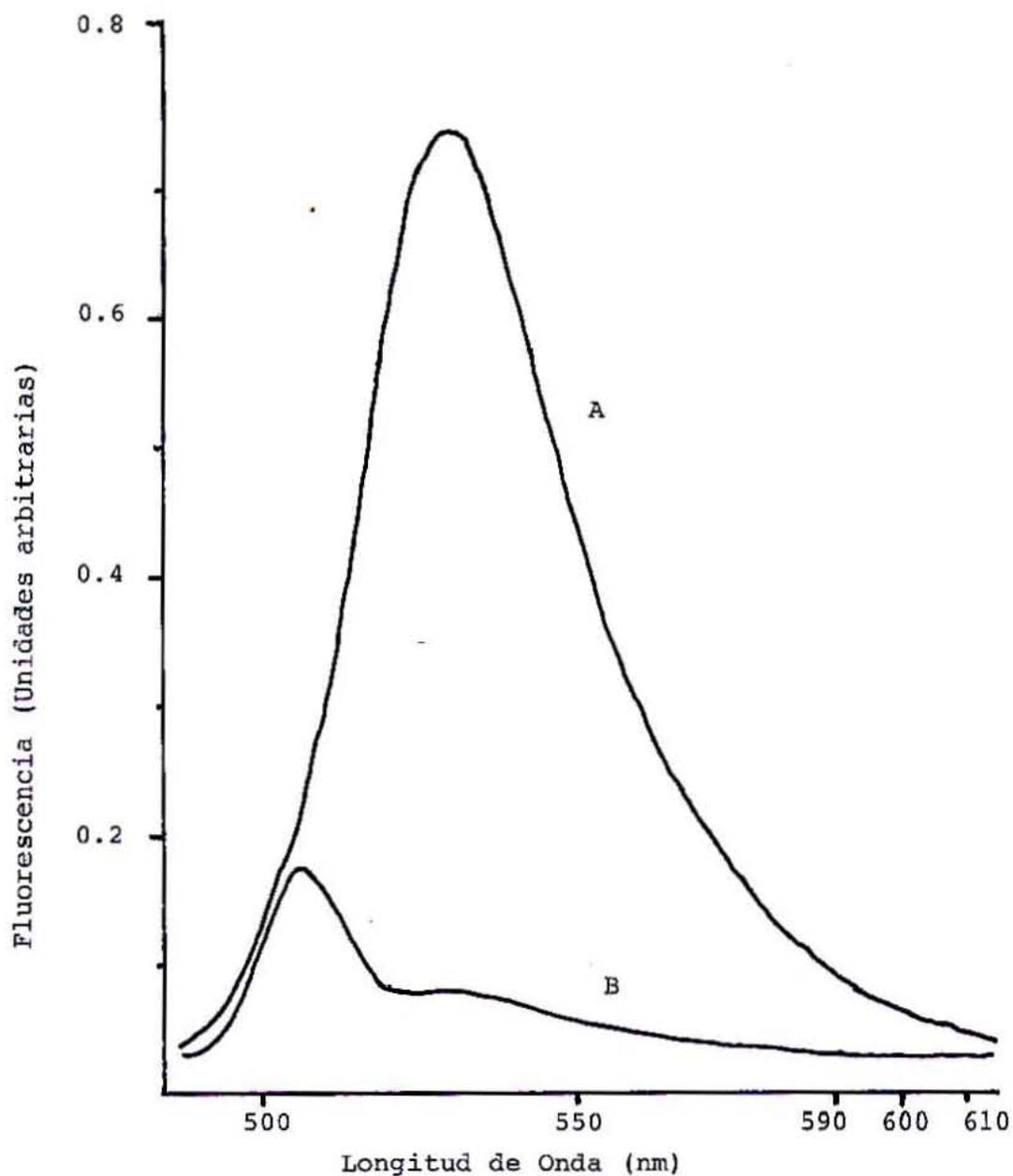


Figura 6. Espectro de emisión de fluorescencia de la BCECF y el efecto de la mezcla $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Se obtuvo el espectro de emisión de la BCECF (Espectro A). Posteriormente se incubó 50 minutos con el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ y se realizó nuevamente el barrido (Espectro B). La longitud de onda de excitación fue de 505 nm. Las condiciones experimentales fueron 5.62 nM de BCECF en buffer de fosfato de potasio 100m M pH 7.0, Cu^{2+} 0.1 mM, H_2O_2 40 mM, temperatura ambiente y agitación constante.

Inicialmente se obtuvo un espectro de emisión para verificar cómo es afectada la fluorescencia de la BCECF por el sistema oxidante empleado para fragmentar a la BSA. En este espectro se observó que la fluorescencia de la BCECF presentó un máximo a una longitud de onda de emisión de 525 nm en ausencia del sistema generador de radicales hidroxilo (Figura 6 A). Cuando a esa mezcla se adicionó el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ y se incubó durante 50 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante, la fluorescencia de la molécula prácticamente desapareció (Fig. 6 B).

6.3 El apagamiento de la fluorescencia de la BCECF es dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno.

Para que el sistema indicador fluorescente pueda ser empleado como un método de análisis válido, su respuesta debe ser lineal con la concentración de las ROS. Por esta razón se determinó la linealidad del método a través del efecto de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno sobre la fluorescencia de la BCECF (Fig. 7).

Para asegurar la obtención de un perfil completo del apagamiento, se realizó el seguimiento de la fluorescencia durante 50 minutos.

Durante los primeros 25 minutos de incubación, se observó una mayor rapidez de apagamiento. Después de este periodo la rapidez disminuye considerablemente. El grado de apagamiento fue dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno, de tal modo que después de 50 minutos en presencia de H_2O_2 40 mM, sólo se conservó el 20% de la fluorescencia inicial. A menores concentraciones el apagamiento disminuyó proporcionalmente. A 30mM se conserva aproximadamente un 35% de la fluorescencia inicial, mientras que a 20 mM se recuperó aproximadamente 45%, a 10 mM se protegió un 55%, a 5 mM se obtiene una protección del 65%, y a 2.5 mM se protegió un 70%.

El apagamiento de la fluorescencia aumentó de manera proporcional a la concentración de H_2O_2 . Sin embargo, se requiere de información cuantitativa para determinar si la respuesta a este método es lineal, por lo que se decidió analizar la cinética de apagamiento. Las líneas en la Fig. 6 muestran que el apagamiento de la fluorescencia siguió una cinética exponencial decreciente para cada concentración. Por tanto, se realizó el ajuste de los datos a un modelo cinético de primer orden (Ecuación 1, secc. 5.2.7). Al hacer esto se pudo obtener la constante de rapidez de apagamiento de la BCECF a diferentes concentraciones de H_2O_2 (Tabla 3). Puesto que éste es un parámetro cuantitativo, puede usarse para analizar la linealidad del método (Fig. 9).

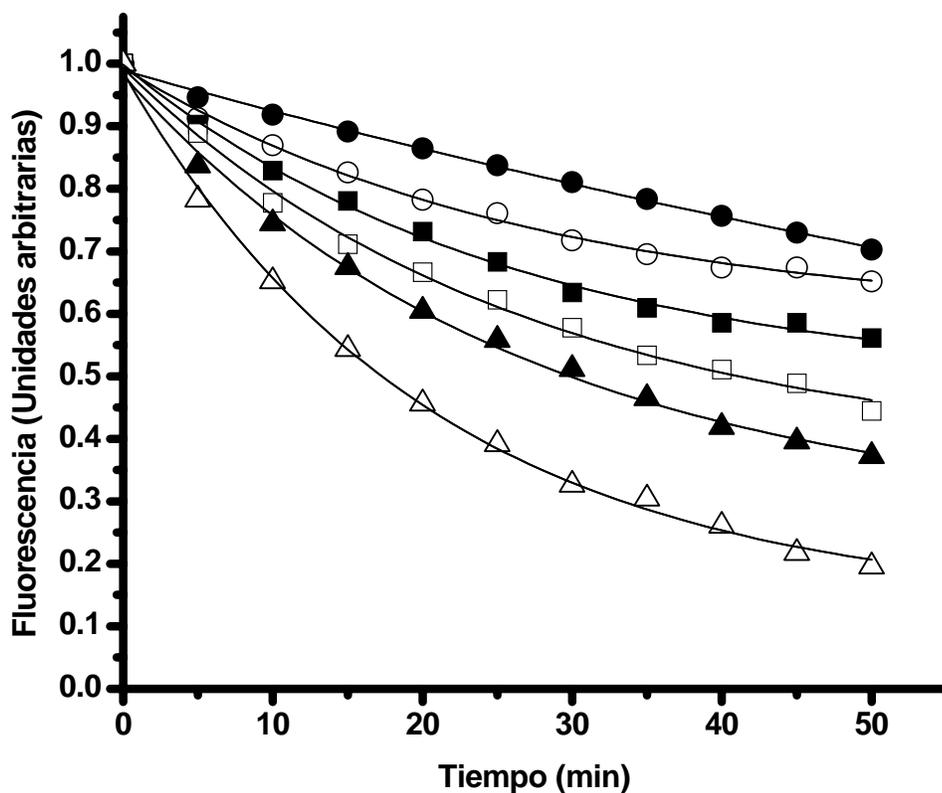


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de H_2O_2 sobre la cinética de apagamiento de la fluorescencia de la BCECF. Las condiciones experimentales fueron: 5.62 nM BCECF y 0.1 mM $CuSO_4$ en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, temperatura ambiente y agitación constante. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 505 y 525 nm, respectivamente. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno fueron: (●) 2.5 mM, (○) 5 mM, (■) 10 mM, (□) 20 mM, (▲) 30 mM, (△) 40 mM. Cada experimento se hizo por triplicado ($n = 3$). La desviación estándar siempre fue menor a 5% y se omitieron las barras para mayor claridad. Las líneas muestran el ajuste a una cinética exponencial decreciente de primer orden (Ecuación 2, secc. 5.2.7) y en cada caso se obtuvo una $r > 0.99$.

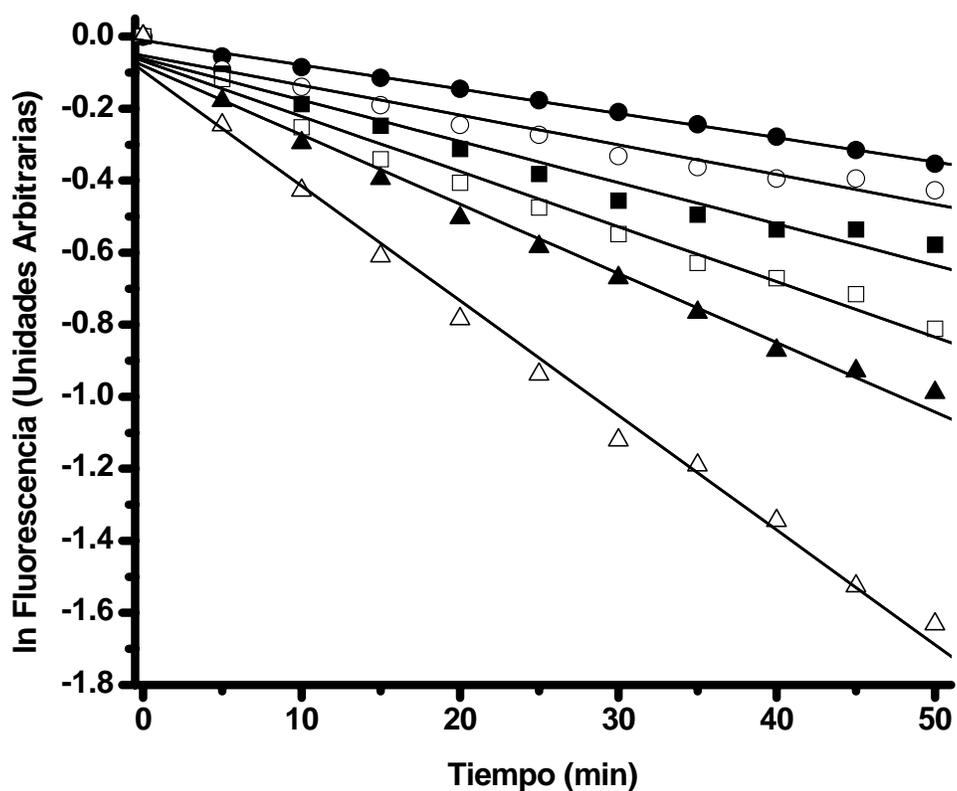


Figura 8. Ajuste del proceso de apagamiento de la BCECF por peróxido de hidrógeno a una cinética de apagamiento de primer orden (Ecuación 2, secc. 4.2.6). Las concentraciones de H₂O₂ son: (●) 2.5 mM, (○) 5 mM, (■) 10 mM, (□) 20 mM, (▲) 30 mM, (△) 40 mM.

El apagamiento de la fluorescencia de la BCEF por peróxido de hidrógeno se ajustó a una cinética de primer orden (Fig. 8). Las líneas de tendencia obtenidas a partir de un análisis de regresión lineal presentaron un coeficiente de correlación (r) > 0.98. De acuerdo a este modelo la pendiente de cada línea es proporcional al valor de la constante de rapidez de apagamiento.

Para cada concentración de peróxido de hidrógeno hay una constante de rapidez de apagamiento (Tabla 3). Conforme aumenta la concentración de H₂O₂, en el control la *k* aumentó de 0.0067 min⁻¹ hasta 0.0319 min⁻¹ en presencia de 40 mM de H₂O₂.

Tabla 3. Constantes de rapidez de apagamiento en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂.

Concentración de H ₂ O ₂	Constante de rapidez de apagamiento (min ⁻¹)
2.5	0.0067
5	0.0083
10	0.0115
20	0.0153
30	0.0192
40	0.0319

La linealidad del método se determinó graficando las constantes de rapidez contra su respectiva concentración de peróxido de hidrógeno. La rapidez del apagamiento aumentó de forma proporcional a la concentración de H₂O₂ (Fig. 9). Por tanto, puede afirmarse que la respuesta del método varía de forma lineal con la concentración de peróxido de hidrógeno.

Para las condiciones empleadas, el uso del apagamiento de la BCECF como indicador mostró ser un método adecuado. Tomando en cuenta esto, en experimentos posteriores la molécula fluorescente se empleó como indicador de la oxidación mediada por radicales hidroxilo.

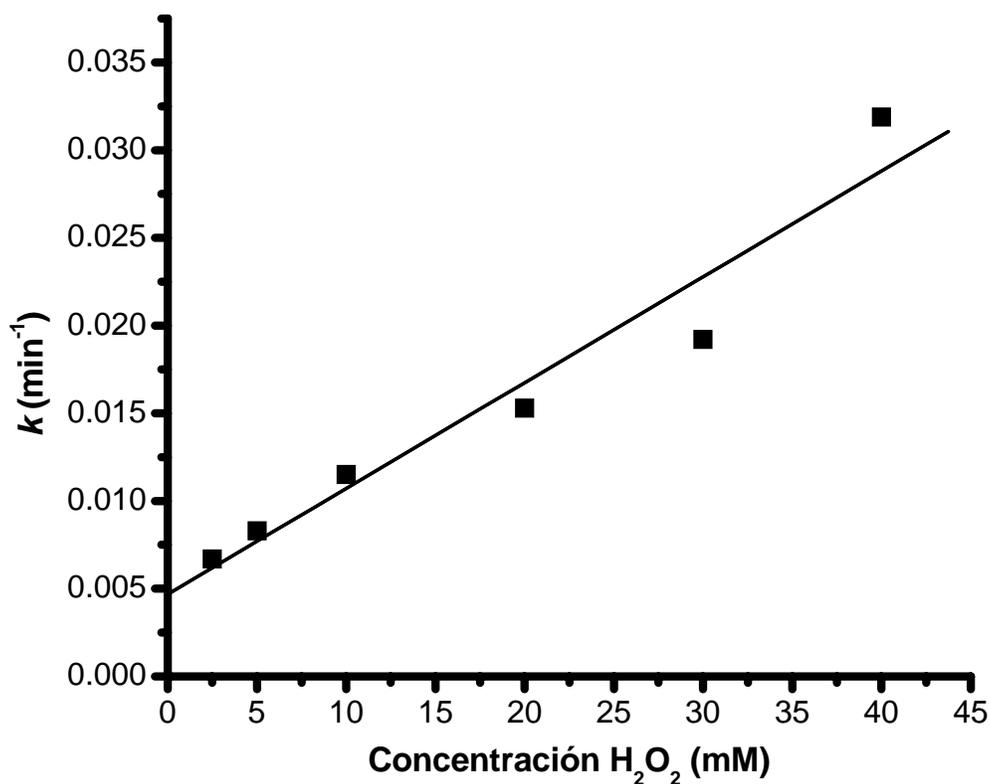


Fig. 9. Constantes de apagamiento de la BCECF en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Con base en el análisis hecho para la figura 8, se tomaron las constantes de rapidez de apagamiento a partir de las pendientes obtenidas por análisis de regresión lineal. Cada constante se graficó contra su respectiva concentración. El coeficiente de correlación (r) fue de 0.96953.

6.4 Comparación entre los efectos protectores de diferentes carbohidratos y un polialcohol empleando la BCECF como indicador.

La protección de la BSA contra la fragmentación por radicales hidroxilo fue dependiente del tipo de carbohidrato (Fig. 4 A-E). Sin embargo en estos experimentos no se obtuvieron datos cuantitativos de la protección. Además, sólo se obtuvo el efecto a una concentración.

Por esto se decidió estudiar el efecto sobre el apagamiento de la BCECF en presencia de diferentes concentraciones de polialcohol ó carbohidrato. A través del método fluorescente desarrollado se puede obtener como parámetro cuantitativo la rapidez del apagamiento, lo cual permite la obtención de la capacidad protectora del soluto y puede hacerse una comparación entre polialcoholes y carbohidratos con base en términos cuantitativos.

Se emplearon los mismos protectores que protegieron a la BSA contra la fragmentación: manitol, galactosa, trehalosa y rafinosa.

La adición de carbohidrato o polialcohol disminuyó la rapidez inicial de apagamiento de la fluorescencia (Fig. 10). Cuando hubo mayor protección, la disminución fue considerable. El trisacárido rafinosa mostró la mayor capacidad protectora con respecto a los demás, alcanzando una rapidez inicial de apagamiento de fluorescencia de 10 U.A. min^{-1} que fue la mayor concentración utilizada de rafinosa (8mM). El siguiente en orden de efectividad fue la trehalosa, que en las mismas condiciones llegó hasta 25 U.A. min^{-1} . Para éstos dos últimos solutos, la rapidez inicial de apagamiento alcanzó un valor constante desde una concentración de 4 mM.

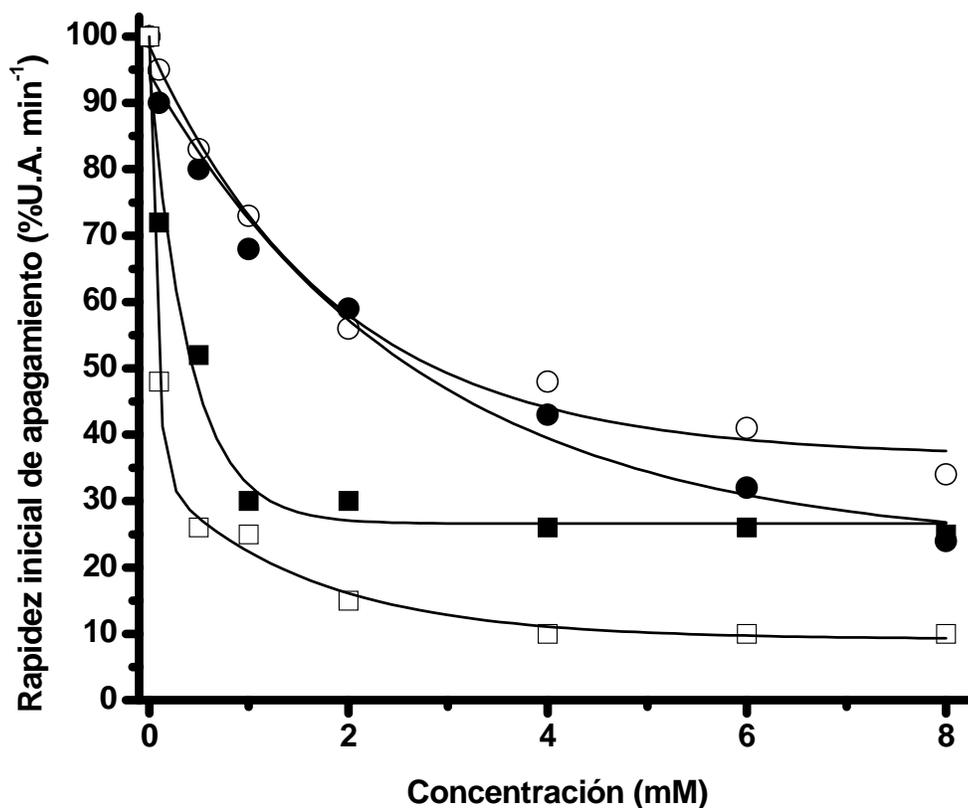


Figura 10. Efecto de manitol, galactosa, trehalosa y rafinosa sobre el apagamiento de la fluorescencia. Las condiciones experimentales fueron similares a la figura 7, Tiempo de incubación 25 minutos (ver secc. 5.2.6). Los protectores fueron: (●) Manitol, (○) Galactosa, (■) Trehalosa y (□) Rafinosa.

El manitol y la galactosa no alcanzaron esta estabilización en la rapidez inicial de apagamiento a altas concentraciones. El manitol también alcanzó una rapidez inicial de 25 U.A. min⁻¹ de manera similar a la trehalosa, sin embargo su efectividad a concentraciones menores es inferior al disacárido. En cambio la galactosa proporcionó una protección considerablemente menor, alcanzando una rapidez de apagamiento de fluorescencia de ~40 U.A. min⁻¹ a una concentración de 8 mM. Esto es 4 veces menos que la protección lograda por la rafinosa.

En los experimentos de apagamiento de fluorescencia de BCECF, la protección fue dependiente del carbohidrato utilizado. Sin embargo el orden de protección no fue el mismo que se observó con la protección de la BSA. El orden fue: trisacárido > disacárido > polialcohol > monosacárido. Aquí parece importar más el peso molecular del protector, ya que entre más subunidades de carbohidrato fue mayor su efecto protector.

El polialcohol presentó una capacidad protectora menor que el disacárido y mayor que el monosacárido. La similitud con la galactosa pudo haber sido consecuencia de su peso molecular, ya que ambos son similares. A pesar de esto, su capacidad protectora fue mejor que el monosacárido.

6.5 Perfil de apagamiento de la BCECF en presencia de trehalosa y rafinosa.

Puesto que el disacárido y el trisacárido preservaron mejor la fluorescencia de la BCECF se decidió realizar un perfil de apagamiento durante 50 minutos. De esta manera se pudo observar el efecto protector durante un periodo de tiempo más extenso, al mismo tiempo que se observó de manera más clara la dependencia del apagamiento con el tiempo en presencia de estos carbohidratos. Debido a que se observó una actividad protectora constante desde una concentración de 4 mM (Fig. 10), ésta fue la máxima concentración empleada en este experimento.

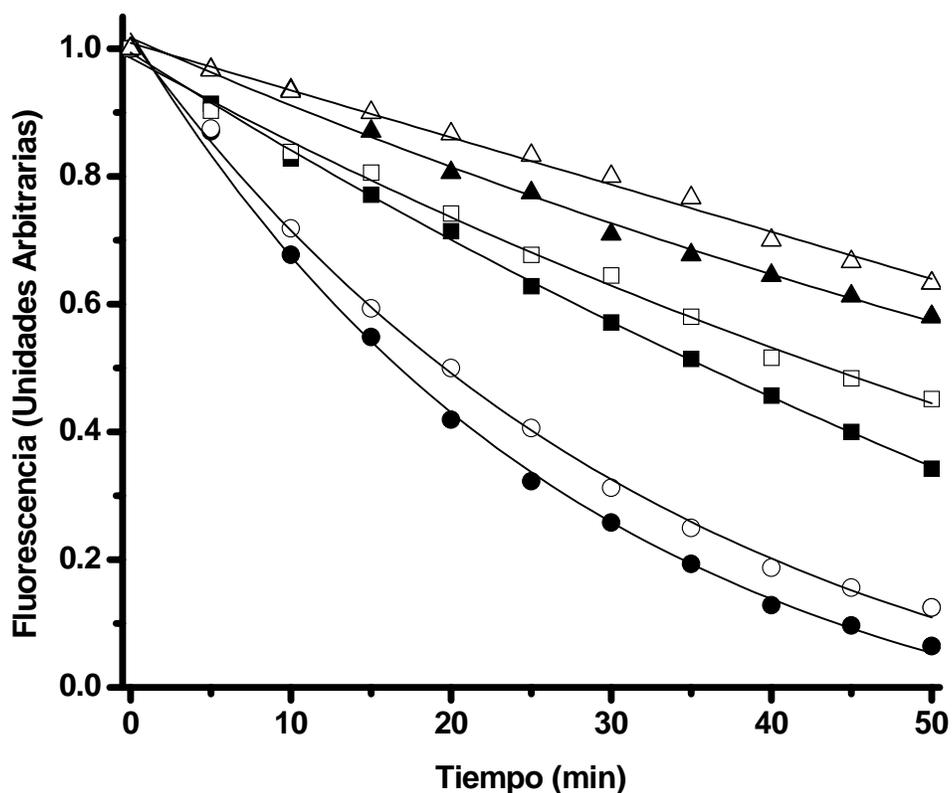


Figura 11. Efecto de la trehalosa sobre el apagamiento del BCECF mediado por radicales hidroxilo. Las condiciones experimentales fueron similares a las figura 7 empleando una concentración de 40 mM H_2O_2 . Las concentraciones de trehalosa fueron: (●) 0, (○) 0.1 mM, (■) 0.5 mM, (□) 1 mM, (▲) 2 mM y (△) 4 mM.

La trehalosa disminuyó la rapidez de apagamiento de la fluorescencia en el rango de concentraciones empleado (Fig. 11). Las líneas de tendencia mostraron un ajuste a una cinética de primer orden, y en éstas se puede observar que hubo una disminución de la rapidez de apagamiento al incrementar la concentración de trehalosa.

En presencia de trehalosa se conservó una fracción de la fluorescencia inicial, la cual aumentó proporcionalmente con la concentración de disacárido. A los 50 minutos se

observó que a 4 mM se conservó ~65%, a 2 mM ~58%, a 1 mM ~45%, a 0.5 mM ~35% y a 0.1 mM ~12% de la fluorescencia inicial.

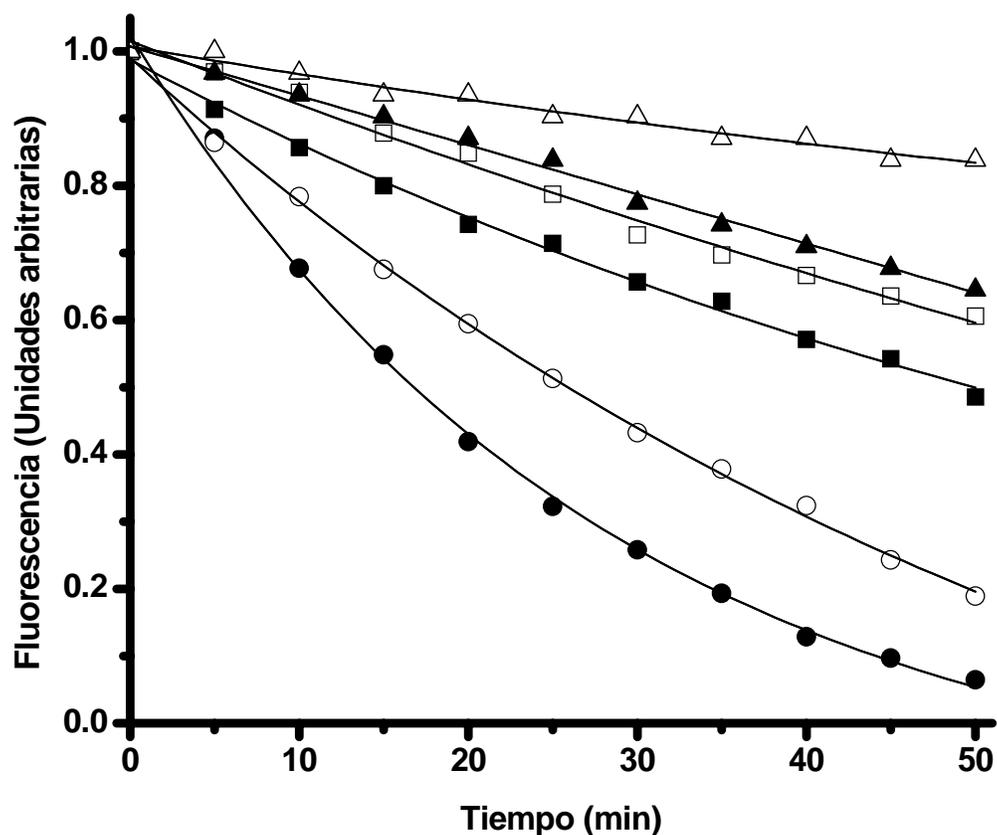


Figura 12. Efecto de la rafinosa sobre el apagamiento del BCECF mediado por radicales hidroxilo. Las condiciones experimentales fueron similares a la figura 11. Las concentraciones de rafinosa fueron: (●) 0, (○) 0.1 mM, (■) 0.5 mM, (□) 1 mM, (▲) 2 mM y (△) 4 mM.

La rafinosa también disminuyó la rapidez del apagamiento de la fluorescencia de la BCECF en un rango de concentración de 0.1 a 4mM (Fig. 12). Con una concentración de 4 mM se conservó ~80% de la fluorescencia inicial, a 2 mM ~65%, a 1 mM 60%, a 0.5 mM

~50% y a 0.1 mM ~20%. Al comparar las figuras 11 y 12 se puede observar que la rafinosa presentó mejor protección que la trehalosa desde una concentración de 0.1 mM, ya que se conservaron ~20% y ~10% de la fluorescencia inicial, respectivamente. Incluso se logró una protección de ~50% empleando 0.5 mM de rafinosa, mientras que se requiere una concentración de 2 mM de trehalosa para lograr este efecto.

6.6 Capacidad protectora de isómeros del manitol y la galactosa.

También se decidió investigar si el efecto protector era el mismo para diferentes isómeros del carbohidrato o del polialcohol. Esto contribuiría a saber si la orientación de los grupos hidroxilo de cada molécula es un factor determinante para la capacidad protectora.

Se compararon el sorbitol y la galactosa, que son isómeros del manitol y la glucosa, respectivamente. El sorbitol es isómero del manitol pues en el carbono 2 difieren en la orientación del grupo hidroxilo. De este mismo modo la galactosa es un isómero de la glucosa por el carbono 4, pues en la glucosa es D y en la galactosa es L. Los carbohidratos que presentan este tipo de isomería se denominan epímeros.

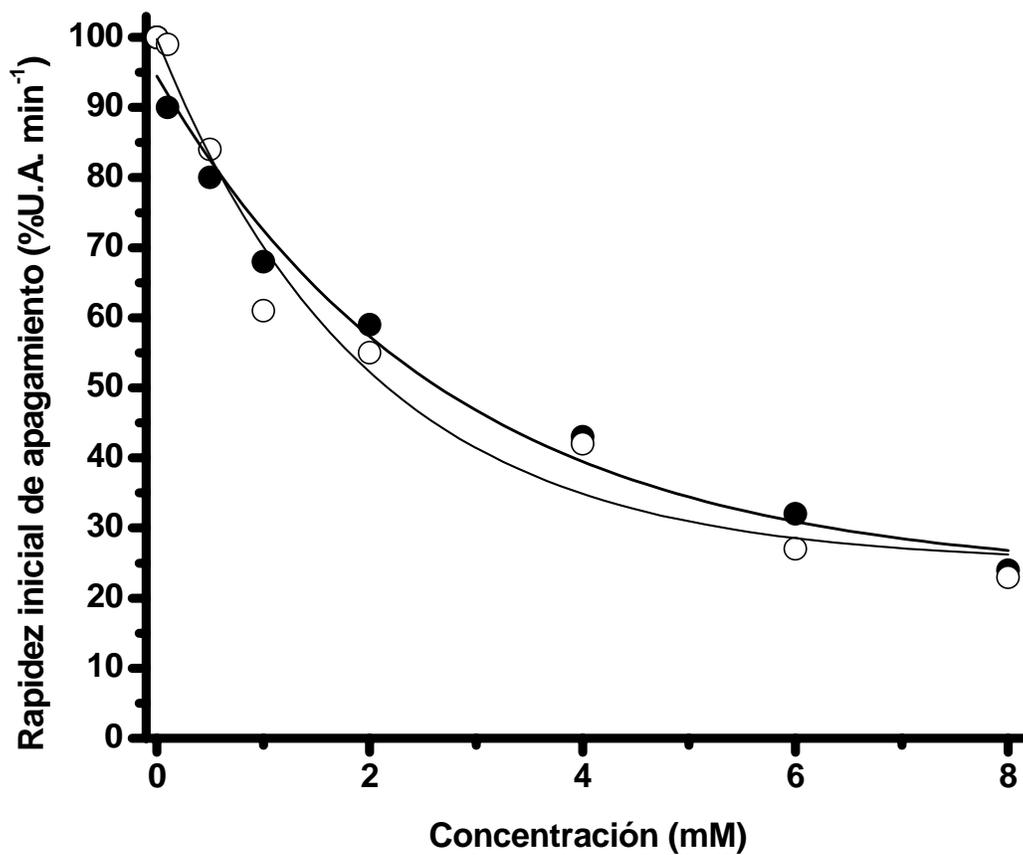


Figura 13. Actividad protectora de manitol (●) y sorbitol (○). Las condiciones experimentales fueron similares a la figura 10.

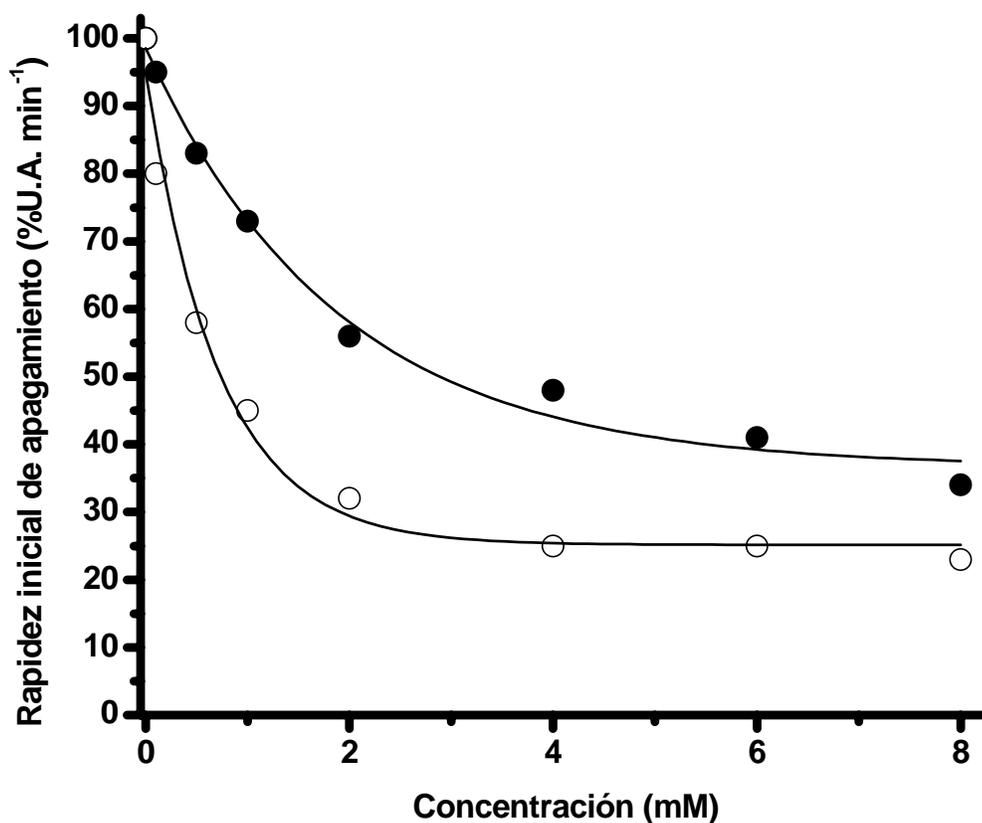


Figura 14. Actividad protectora de galactosa (●) y Glucosa (○). Las condiciones experimentales fueron similares a la figura 10.

Los dos polialcoholes tuvieron una actividad antioxidante similar (Fig. 13) ya que en ambos se observa el mismo comportamiento protector. A concentración de 8 mM ambos polialcoholes inhibieron el apagamiento de la fluorescencia hasta llegar a una rapidez de 25 U..A. min¹

La diferencia entre la galactosa y la glucosa fue drástica: la galactosa exhibió una protección mucho menor que la glucosa (Fig. 14). Con 8 mM de galactosa se alcanzó una

rapidez de apagamiento de la fluorescencia de 35 U.A. min^{-1} , mientras que con glucosa 8mM se llegó a 20 U.A. min^{-1} . Ambos carbohidratos presentaron protecciones completamente diferentes y puede decirse que hay diferencia en cuanto a su actividad protectora. A glucosa 4mM y mayor, se presentó una estabilización en la rapidez inicial de apagamiento. Esta característica es similar a la que se observó con la rafinosa y la trehalosa (secc. 5.4, Fig. 10).

En resumen, demostramos que los carbohidratos y polialcoholes son protectores de macromoléculas contra el estrés oxidativo. Esto no había sido evaluado de manera directa hasta ahora. Estos evitaron la proteólisis de la BSA y evitaron el apagamiento de la fluorescencia de la BCECF.

Hubo algunas diferencias entre los modelos de fragmentación y pérdida de fluorescencia en cuanto a la protección. Estas pudieron resultar de la diferencia en reactividad entre la BSA y la BCECF.

7. DISCUSIÓN

En concentraciones fisiológicas los metales de transición y el peróxido de hidrógeno provocan daño proteico a nivel de residuos susceptibles; sobre todo aquellos que están unidos con metales. Para prevenir este tipo de oxidación, los secuestradores de radicales hidroxilo no son efectivos (61). Durante el daño, se modifica la proteína, principalmente a través de la introducción de grupos carbonilo al oxidarse en residuos de lisina o arginina (62). Además, cuando la concentración de H_2O_2 ó Cu^{2+} es muy alta, se observa la fragmentación de la proteína. Este proceso ocurre en presencia de metales de transición a través de la formación de radicales alquil-peroxilo en la proteína. Otra vía de fragmentación proteica proviene de la oxidación de residuos de aminoácido, en especial prolina y glutamato (15).

En nuestros experimentos la concentración de peróxido de hidrógeno empleada para el experimento fue muy alta (40 mM) y por ello el efecto predominante que se observó fue la proteólisis. Es decir, que los radicales hidroxilo generados por el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ destruyeron las uniones peptídicas de la BSA y su efecto aumentó con el tiempo de incubación.

Los radicales hidroxilo tienen una vida media muy corta, del orden de nanosegundos (63). Por lo tanto, la proteólisis debe resultar de un proceso donde el radical libre sea regenerado una y otra vez. De esta manera puede existir una cadena o ciclo de reacciones a través de las cuales se mantenga constante la concentración de radicales libres en el sistema (15).

Se ha logrado prevenir la modificación oxidativa de las proteínas mediada por radicales libres usando compuestos antioxidantes (64). Los tipos de antioxidantes que se han

empleado contra los efectos del estrés oxidativo son de naturaleza variada. Entre los comúnmente empleados se encuentran: las vitaminas C, E y los polifenoles. La información relacionada con el papel protector de los carbohidratos contra la oxidación es limitada. Además, hasta ahora no se ha demostrado que la presencia de antioxidantes pueda prevenir la proteólisis mediada por radicales libres, en particular las ROS.

Se demostró que la protección contra la fragmentación puede lograrse por la presencia de carbohidratos y polialcoholes. Un aspecto interesante es que éstos actuaron a una concentración comparable con la que es acumulada *in vivo* por las levaduras (50).

A través de pruebas de termoprotección de proteínas *in vitro*, empleando concentraciones fisiológicas de trehalosa, se demostró que este soluto compatible es vital para que la célula tolere el calentamiento. Esta información resultó útil para extrapolar el papel del soluto compatible a condiciones *in vivo* (65). A partir de los resultados obtenidos puede hacerse una extrapolación sobre la participación de este disacárido durante el estrés oxidativo: esto podría explicar porqué los solutos compatibles como manitol y trehalosa son acumulados en algunos organismos sometidos a estrés oxidante (42).

Si los carbohidratos y polialcoholes funcionan como protectores contra la actividad oxidante de la especie ROS más reactiva, podría esperarse que muestren el mismo efecto para las demás ROS.

El manitol y la trehalosa fungen como solutos compatibles en diversos microorganismos (42). Se ha postulado que el papel protector del manitol contra las ROS está dado por su capacidad para eliminar o secuestrar a los radicales hidroxilo (47). Lo que apoya los resultados obtenidos aquí. La trehalosa podría *in vivo* actuar como secuestrador de radicales hidroxilo.

Los antioxidantes se han clasificado según su mecanismo de acción en: antioxidantes preventivos y antioxidantes “que interrumpen la cadena” (66). Los del tipo preventivo inhiben la formación de ROS, mientras que los últimos eliminan o secuestran al radical libre, impidiendo que se produzca la secuencia de reacciones que conduce a más radicales libres. El antioxidante puede interrumpir la cadena de reacción a través de dos mecanismos: donando un átomo de hidrógeno (H·) o donando un electrón . En ambos casos se produce un radical estable.

La fragmentación de la BSA probablemente resulta de una cadena de reacciones que regeneran un radical libre (15). Los solutos empleados evitan este proceso, tal vez impidiendo dicha regeneración. Por lo tanto muestran características propias de antioxidantes que “interrumpen la reacción en cadena”. En este sentido, se ha demostrado que los carbohidratos y polialcoholes eliminan los radicales hidroxilo generados por el sistema Fenton por medio de la formación de radicales estables o reaccionando con éstos para generar productos de oxidación aldehídicos (67). Esta protección es directamente proporcional al número de grupos hidroxilo en su estructura (67). Estos resultados explican porqué la protección contra el apagamiento de la BCECF fue mayor al aumentar el número de hidroxilos: trisacárido > disacárido > polialcohol > monosacárido.

A excepción del trisacárido, todos los solutos mostraron una cinética de primer orden. Esto significa que la inhibición del apagamiento depende de la concentración de estos solutos. Para la rafinosa se observó una cinética de segundo orden, lo cual indica que la inhibición depende de dos elementos en la molécula. Un incremento de disacárido a trisacárido aumentó el orden de reacción. Probablemente esto se deba a que en el trisacárido existan dos poblaciones diferentes de grupos hidroxilo.

El grupo funcional OH es de gran importancia para la actividad antioxidante de diversos compuestos. Como ejemplos pueden mencionarse a los polifenoles (68) y el etanol (69). Ambos tipos de compuesto tienen la capacidad de reaccionar con las ROS para formar radicales menos reactivos. Según los resultados obtenidos aquí, el grupo hidroxilo también confiere actividad antioxidante a los polialcoholes y carbohidratos.

Otra característica estructural importante con relación a estos grupos funcionales es la orientación que presenten en la molécula. Se han elaborado estudios donde se demuestra que la estereoquímica de los grupos hidroxilo en polialcoholes y carbohidratos es clave para la criopreservación en plantas (70). Según los resultados, el efecto de la orientación parece ser más importante para los carbohidratos que para los polialcoholes. Esto puede deberse a la complejidad estructural de los carbohidratos en solución acuosa, ya que éstos se encuentran principalmente en forma cíclica y la orientación de los grupos hidroxilo determina el predominio de su forma estereoquímica más estable. Así, el efecto antioxidante dependería de la conformación que adquiriera el carbohidrato en solución.

Debido a la presencia de un soluto en altas concentraciones pueden modificarse significativamente las interacciones de la proteína con el agua. Los carbohidratos y polialcoholes en estas concentraciones favorecen un proceso de hidratación preferencial (71) que consiste en la exclusión completa de las moléculas de soluto de la vecindad inmediata de la proteína favoreciendo la hidratación de la macromolécula. Esto trae como consecuencia la formación de una capa de agua entre la proteína y el soluto. Se ha propuesto que la hidratación preferencial es el mecanismo en el que se basa la protección de las proteínas dada por carbohidratos y polialcoholes cuando son sometidas a altas presiones (72) o cuando se exponen a altas temperaturas (73).

Tomando en cuenta la concentración de soluto empleada (0.6M), se tiene que pensar que el fenómeno de hidratación preferencial ocurrió en el caso de la BSA. Estos solutos al estar completamente excluidos de la vecindad inmediata de la proteína pueden formar una barrera que atrapa o reacciona con los radicales libres de la solución, antes de que lleguen a la proteína.

Una característica común de los mejores protectores de la BSA probados aquí es que no contienen un grupo reductor. La trehalosa contiene un enlace glucosídico 1→1 y los dos extremos reductores de las subunidades de glucosa están involucrados en este enlace covalente, mientras que el manitol es un polialcohol. De manera interesante, la tolerancia a la desecación en plantas está correlacionada con la cantidad de disacáridos u oligosacáridos no reductores (74). Además, los carbohidratos que son acumulados como solutos compatibles no son de carácter reductor (42).

Una causa probable por la cual no se acumulan carbohidratos reductores *in vivo* es la existencia de la reacción de Maillard, a través de la cual se provoca un daño hacia las proteínas. Esta se caracteriza por la formación de una base de Schiff entre el extremo reductor del carbohidrato y uno de los residuos básicos de la proteína, lisina ó arginina. La base de Schiff experimenta un rearrreglo para dar lugar a cetoaminas denominadas productos Amadori (75). Estos productos también se oxidan en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, conduciendo a la fragmentación de la cadena del carbohidrato para producir compuestos dicarbonílicos reactivos, como el glioxal y el metilglioxal. Estos a su vez pueden volver a interactuar con residuos básicos en la proteína formando nuevamente bases de Schiff. Se ha observado que la BSA forma aductos con el

metilglioxal, y que libres en presencia de oxígeno tal unión constituye un centro generador de radicales (76).

La presencia del grupo reductor disminuyó la protección contra la proteólisis de la BSA. La influencia de éste puede ser explicada a través de dos posibles mecanismos: a) que el extremo aldehído reduzca al cobre y favorezca la reacción de Fenton, y b) que el radical hidroxilo reaccione con estos carbohidratos de forma más rápida, favoreciendo su fragmentación oxidativa disminuyendo la cantidad de soluto disponible para lograr una protección.

Se ha determinado el grado de hidratación de la ribonucleasa A en presencia de los carbohidratos glucosa y trehalosa, resultando en un valor de 130 y 400 moléculas de agua por proteína, respectivamente (71). También se ha concluido que el radio de hidratación de la trehalosa es mayor que el de otros carbohidratos y debido a esto está completamente excluida de la capa de hidratación de la proteína (77). Esto puede ser la base para explicar sus propiedades protectoras superiores a las de otros compuestos (78). Tales resultados parecen indicar que el tamaño y tipo de soluto influyen en la hidratación preferencial. Estas mismas características también influyeron en la protección contra la proteólisis de la BSA. Por tanto, las diferencias entre el grado de protección pueden deberse a distintos grados de hidratación de la proteína que están en función de la estructura del soluto protector.

Los carbohidratos y los polialcoholes cuando se encuentran en altas concentraciones en una solución acuosa aumentan la viscosidad del medio. Se ha demostrado que la viscosidad es un factor que influye en los procesos de actividad enzimática y desnaturalización proteica debido a un impedimento en la libertad de movimiento de dominios, bloqueando la transición entre las diferentes conformaciones de la proteína (79, 80).

La viscosidad generada en el medio de incubación por la presencia de carbohidrato o polialcohol puede tener una contribución en la actividad protectora. Al aumentar la viscosidad del medio se limitaría la difusión de los radiales hidroxilo o de las especies que participan en su generación y al mismo tiempo se mantendría a la proteína en su estado más compacto evitando su interacción con el medio.

8. CONCLUSIONES

- El sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ genera radicales hidroxilo que fragmentan a la BSA.
- Los carbohidratos y polialcoholes protegen contra la fragmentación proteica mediada por $\text{OH}\cdot$.
- Los solutos que no tienen un extremo reductor son mejores protectores.
- La protección contra esta proteólisis se logra a concentraciones que se alcanzan *in vivo* por células de levadura sometidas a estrés.
- El método fluorescente desarrollado para medir los efectos de radicales libres es sensible hacia el sistema $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ y su respuesta es lineal con la concentración de H_2O_2 .
- A través de este método se puede caracterizar al soluto protector a través de su constante de rapidez ó de la rapidez inicial de apagamiento.
- Los carbohidratos y polialcoholes protegen a la fluorescencia de la BCECF contra el apagamiento mediado por radicales hidroxilo.
- Esta protección es dependiente de la concentración y número de hidroxilos en la estructura del soluto. Los mejores protectores de la fluorescencia fueron la trehalosa y la rafinosa.

APÉNDICE: ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
BCECF	2',7'-Bis-Carboxietil-5(6)-Carboxifluoresceína
BSA	Albúmina del suero bovino
DMT1	Transportador de cationes metálicos divalentes
E ⁰	Potencial de reducción estándar
GSH	Glutación (forma reducida)
GSSG	Glutación dimerizado (forma oxidada)
Hsp	Proteínas del choque térmico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamina
Tps1p	Trehalosa 6-fosfato sintasa
Tps2p	Trehalosa 6-fosfato fosfatasa
Tsl1p	Subunidad regulatoria del complejo trehalosa fosfato sintasa
U.A.	Unidades arbitrarias

9. REFERENCIAS

1. Nelson DL, Cox MM (2000) Lehninger Principles of Biochemistry, Third edition, Worth Publishers, New York, Capítulo 19: Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, 659-690.
2. Stryer L (1988) Biochemistry, Third Edition, WH Freeman and Company, New York, Capítulo 17: Oxidative Phosphorylation, 397-424.
3. Fridovich I, (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?, *Ann NY Acad Sci*, 893, 13-18.
4. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, 82 (1), 47 – 95.
5. Seaver LC, Imlay JC (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*, *J. Bacteriol*, 183 (24), 7182-7189.
6. Massey V (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins, *J Biol Chem*, 269 (36), 22459-22462.
7. Victor VM, Rocha M, De La Fuente M (2004) Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis, *Int Immunopharmacol*, 4 (3), 327-47.
8. Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189 (1-2), 41-54.
9. Matés M (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology, *Toxicology*, 153 (1-3), 83-104.
10. Dickinson DA, Forman HJ (2002) Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol, *Ann NY Acad Sci*, 973, 488-504.

11. Papp E, Nardai G, Söti C, Csermeley P (2003) Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis, *Biofactors*, 17 (1-4), 249-57.
12. Andrews NC (2000) Iron Metabolism: Iron deficiency and iron overload, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 75-98.
13. Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev*, 78 (2), 547-581.
14. Feinendegen LE (2002) Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents, *Hum Exp Toxicol*, 21 (2), 85-90.
15. Stadtman ER, Berlett, BS (1997) Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease, *Chem Res Toxicol*, 10 (5), 485-94.
16. Cross CE, Valacchi G, Schock B, Wilson M, Weber S, Eiserich J, van der Vliet A (2002) Environmental oxidant pollutant effects on biologic systems: a focus on micronutrient, antioxidant-oxidant interactions, *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (12 pt 2), S44-50.
17. Granot E, Kohen R (2004) Oxidative stress in childhood – in health and disease states, *Clin Nutr*, 23 (1), 3-11.
18. Fessenden RJ, Fessenden JS (1983) Química Orgánica, Primera edición, Grupo Editorial Iberoamérica, México, 223-245.
19. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (1980) Techniques in free radical research, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology Vol. 8, Elsevier, Netherlands, 1-18.
20. Imlay JA (2003) Pathways of Oxidative Damage, *Ann Rev Microbiol*, 57, 395-418.
21. Davies MJ (2003) Singlet-oxygen mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem Biophys Res Commun*, 305 (3), 751-70.

22. Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation, *J Exp Biol*, 201 (Pt 8), 1203-9.
23. Harrison PM, Hoare RJ (1980) Metal in Biochemistry, Chapman and Hall, USA, 46-60.
24. Liochev SI, Fridovich I (2002) The Haber-Weiss cycle – 70 years later: an alternative view, *Redox Rep*, 7 (1), 59-60.
25. Dikalov SI, Vitek MP, Mason RP (2004) Cupric amyloid beta peptide complex stimulates oxidation of ascorbate and generation of hydroxyl radicals, *Free Radic Biol Med*, 36 (3), 340-7
26. Andrews NC (2002) Metal transporters and disease, *Curr Opin Chem Biol*, 6 (2), 181-6.
27. Kruszewski M (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress, *Mutat Res*, 531 (1-2), 81-92.
28. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin B, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature*, 388 (6641), 482-8.
29. Petrat F, De Groot H, Rauen U (2002) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells, *Biol Chem*, 383 (3-4), 489-502.
30. Babcock GT (1999) How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proc Natl Acad Sci*, 96 (23), 12971-12973.
31. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N (1998) Copper transport, *Am J Clin Nutr*, 67 (5 Suppl), 965S-971S.

32. Turnlund JR (1998) Human whole-body copper metabolism, *Am J Clin Nutr*, 67 (5 Suppl), 960S-964S.
33. Gaetke LM, Chow CK (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology*, 189 (1-2), 147-63.
34. Higuchi Y (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress, *Biochem Pharmacol*, 66 (8), 231-251
35. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat Res*, 531 (1-2), 231-51.
36. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001) Molecular Biology of the cell, Fourth edition, Garland Science, 269-271.
37. Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation, *Ann NY Acad Sci*, 899, 191-208.
38. Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H (1999) Etheno-DNA base adduct from endogenous reactive species, *Mutat Res*, 424 (1-2), 59-69.
39. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A (2002) Oxidized low-density lipoprotein induced-apoptosis, *Biochim Biophys Acta*, 1585 (2-3), 213-21.
40. Stadtman ER (2004) Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation, *Arch Biochem Biophys*, 423 (1), 2-5.
41. Farber JM, Levine RL (1986) Sequence of a peptide susceptible to Mixed-Function Oxidation, *J Biol Chem*, 261(10), 4574-4578
42. Welsh DT (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate, *FEMS Microbiol Rev*, 24 (3), 2000, 263-90.

43. Roesser M, Muller V (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences, *Environ Microbiol*, 3 (12), 743-54.
44. Kempf B, Bremer E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes: a microbial stress responses to high-osmolality environments, *Arch Microbiol*, 170 (5), 319-330.
45. Holtmann G, Bremer E (2004) Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters, *J Bacteriol*, 186 (6), 1683-93.
46. Anderson MM, Breccia JD, Hatti-Kaul R (2000) Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase, *Biotechnol Appl Biochem*, 32, 145-153.
47. Shen B, Jensen RG, Bonhert HG (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, *Plant Physiol*, 115 (2), 527-532.
48. Argüelles JC (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis, *Arch Microbiol*, 174 (6), 217-24.
49. Sampedro JG, Guerra G, Pardo JP, Uribe S (1998) Trehalose-mediated protection of the plasma membrane from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration, *Criobiology*, 37 (2), 131-8.
50. Sampedro JG, Cortes P, Muñoz-Clares RA, Fernández A, Uribe S (2000) Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose, *Biochim Biophys Acta*, 456 (2-3), 67-76.
51. Singer MA, Lindquist S (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Yin Yang of Trehalose, *Trends Biotechnol*, 16 (11), 460-8.

52. Lillie SH, Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation, *J Bacteriol*, 143 (3), 1384-94.
53. Wiemken A (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate reserve, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 58 (3), 209-17.
54. Hottiger T, Boller T, Wiemken A (1987) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts, *FEBS Lett*, 220 (1), 113-15.
55. Pedreño Y, Gimeno-Alcaniz JV, Matallana E, Argüelles JC (2002) Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes, *Arch Microbiol*, 177 (6), 494-9.
56. Pereira MD, Eleutherio EC, Panek AD (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Microbiol*, 1 (1), 1-11.
57. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals, *J Biol Chem*, 276 (26), 24261-24267.
58. Bergmeyer HU (1955) Measurement of catalase activity, *Biochem Z*, 327 (4), 255-8.
59. Naguib YM (2000) A fluorometric method for measurement of oxygen radical-scavenging activity of water-soluble antioxidants, *Anal Biochem*, 284 (1), 93-8.
60. Russel DA, Pottier RH, Valenzano DP (1995) In vivo spectroscopic properties of the fluorescent pH indicator biscarboxyethyl carboxyfluorescein, *J Photochem Photobiol B*, 29 (1), 17-22.
61. Stadtman ER, Berlett BS (1991) Fenton Chemistry. Aminoacid Oxidation, *J Biol Chem*, 266 (26), 17201-11.

62. Ghezzi P, Bonetto V (2003) Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins, *Proteomics*, 3 (7), 1145-53.
63. Cheng FC, Jen JF, Tsai TH (2002) Hydroxyl radicals in living systems and its separation methods, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 781 (1-2), 481-96.
64. Ernst A, Stolzing A, Sandig G, Grune T (2004) Antioxidants effectively prevent oxidation-induced protein damage in OLN 93 cells, *Arch Biochem Biophys*, 421 (1), 54-60.
65. Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, Boller T, Wiemken A (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increases the thermal stability of proteins in vitro, *Eur J Biochem*, 219 (1-2), 187-93.
66. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodil M, Flanagan JA, Deemer EK (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study, *J Agric Food Chem*, 50 (11), 3122-8.
67. Morelli R, Russo-Volpe S, Bruno N, Lo Scalzo R (2003) Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars, *J Agric Food Chem*, 51 (25), 7418-25.
68. Bonnefont-Russelot D, Rouscilles A, Bizard C, Delattre J, Jore D, Gardes-Albert M (2000) Antioxidant effect of ethanol towards *in vitro* peroxidation of human lipid low-density lipoproteins initiated by oxygen free radicals, *Radiation Res*, 155 (2), 279-287.

69. Cheng Z, Ren J, Li Y, Chang W, Chen Z (2002) Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship, *Bioorg Med Chem*, 10 (12), 4067-73.
70. Turner S, Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K, Tan B (2001) Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcoholic molecules as an important factor in effective cryopreservation, *Plant Sci*, 160 (3), 489-497.
71. Timasheff SN (2002) Protein hydration, thermodynamic binding and preferential hydration, *Biochemistry*, 41 (46), 13473-82.
72. Ruan K, Xu C, Li T, Li J, Lange R, Balny C (2003) The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding, *Eur J Biochem*, 270 (8), 1654-61.
73. Lee JC, Timasheff SN (1981) The stabilization of proteins by sucrose, *J Biol Chem*, 256 (14), 7193-7201.
74. Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Sci*, 6 (9), 431-8.
75. Thorpe SR, Baynes JW (2003) Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives, *Amino Acids*, 25 (3-4), 275-81.
76. Yim MB, Yim HS, Lee C, Kang SO, Chock PB (2001) Protein glycation: creation of catalytic sites for free radical generation, *Ann NY Acad Sci*, 928, 48-53.
77. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F (2001) The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cell in the dry state, *Cryobiology*, 43 (2), 89-105.

78. Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR (1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars?, *Arch Biochem Biophys*, 360 (1), 10-14.
79. Uribe S, Sampedro JG (2003) Measuring solution viscosity and its effects on enzyme activity, *Biol Proceed Online*, 5, Epub 2003, 108-115.
80. Sampedro JG, Uribe S (2004) Trehalose-enzyme interaction result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity, *Moll Cell Biochem*, 256-257 (1-2), 319-27.