



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE
LIPOPEROXIDACION Y SU RELACIÓN CON LA
PROGRESION DE LA ENFERMEDAD PULMONAR
OBSTRUCTIVA CRÓNICA EN MEMBRANAS DE
ERITROCITO HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

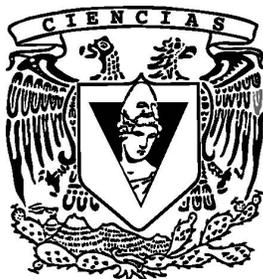
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

KESIA MARITZA Jael SIERRA JIMÉNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. YESSICA DORIN TORRES RAMOS



2009



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.

Esta tesis se realizó en:

El laboratorio de Bioquímica Inorgánica, Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental. Subdirección de Investigación Biomédica. Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. "Ismael Cosío Villegas". México, D.F.

Con el apoyo del Sistema Nacional de Investigadores (SIN)

- Beca de Ayudante de Investigador Nacional Nivel III de Septiembre 2008 septiembre 2009.

AGRADECIMIENTOS

Por la Dirección de Tesis:

M. en C. Yessica Dorin Torres Ramos

Investigador A del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Por la orientación, confianza y apoyo incondicional:

Dr. Juan José Hicks Gómez,

Jefe del Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Dr. Alberto M. Guzmán Grenfell

Jefe del laboratorio de Bioquímica Inorgánica y Medicina Ambiental.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

**GRACIAS A DIOS POR DARME FE Y ESPERANZAS EN LOS MOMENTOS
DIFÍCILES.**

**Agradezco de todo corazon a mi segundo hogar en donde me desarrolle en
todos los aspectos y donde descubri la palabra “pasion”:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES PLANTEL SUR**

**A mis nuevos amigos por hacerme más divertida la vida, por su amistad,
confianza y consejos:**

M. en C. Yessica Dorin Torres Ramos

M.C., MSc. Martha Patricia Sierra Vargas

M en I. Ma. Angélica Velázquez González

M en C. Araceli Montoya Estrada

M en C. Emilio

Por el apoyo tecnico:

Técnica Superior, Martha Elena Munguía Castro

Secretaria, Yolanda Arce Herrera

Por el apoyo profesional:

Biol. Nayeli Goretti Nieto Velázquez

Por las facilidades otorgadas:

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

“ISMAEL COSIO VILLEGAS”

A todo el personal del Instituto que brindaron las facilidades necesarias para

la realización de esta tesis.

***Dedico éste trabajo a mis dos grandes amores:
Mi Hijo: Joshua García Sierra, desde que llegaste
a mi vida todo es amor y felicidad, tu sonrisa
iluminó mi camino y me dio la fuerza para llegar
hasta aquí, TE AMO.***

***Mi Esposo: Jesús García Santillán, solo puedo
decirte que gracias a tu amor, comprensión,
apoyo y amistad pude cerrar este ciclo, gracias
por hacerme sentir que soy una mejor persona y
por hacer que valga la pena vivir. Eres el amor
de mi vida.***

A mi Padre Miguel Sierra Escudero:

Por todo el amor y consejos que me has dado.

**A mi Madre Maritza Jiménez de la Mora, porque a pesar de todo siempre
estuviste conmigo y con tu ejemplo pude cumplir este sueño.**

A mis Hermanos:

**Emmanuel Sierra Jiménez, gracias por cuidarme desde siempre y por ser mi
ejemplo a seguir. Eres mi alma gemela**

Margarita Isabel Sierra Solís, por tus sonrisas y por darme esperanzas.

Por sus cuidados, consejos y amor:

A mi Abuelita Ma. Del Refugio de la Mora Ávila

A mi Tía Alma Ruth Jiménez de la Mora

**A mis Tíos Helio Marco Antonio Jiménez de la Mora y Héctor Simón Jiménez
de la Mora.**

**A mi segunda familia por su apoyo incondicional y por haber estado
conmigo en los momentos más difíciles de mi vida:**

Sr. Jesús García Juárez

Sra. María Elena Santillán Jiménez

Andrés García Santillán

Leticia Fernández

Armando García Fernández

Mauricio García Fernández

Andrés García Fernández

Lidia García Santillán y Arturo Lopez

Cristóbal García Lopez

Eduardo García Santillán

Alondra Ocampo

A mis amigos de toda la vida:

**Cesar (Pinky), Elia, Chio, Abril, Elizabeth, Engels, Lenin, Paola, Alejandra,
Paulina, Miguel, Pollo, Fer, Erica, Susana, Fabiola, por los buenos tiempos y
los viernes sociales.**

**La noche quedó atrás,
un nuevo día se asoma en tu horizonte de ventura,
en lo que fuera llanto hay alegría,
en lo que fue rencor hoy hay ternura.**

**Ya eres otro,
bajo el conjuro de la palabra amor te has superado,
todo es más noble en ti, todo es más puro,
porque todo de amor se te ha llenado.**

**Amar y solo amar,
esa es la clave que mueve al universo, a la vida,
lo duro de la senda es más suave,
si tu puedes decir ama y olvida.**

**Amar a Dios, a ti, al mundo entero
a los que tú conoces, al extraño, al rico,
al poderoso, al pordiosero,
al que te da la paz o te hace daño.**

**Tú ya eres otro,
porque has podido arrancar
la cadena que te ataba a tu eterno imposible
y has sabido trasponer el dolor que te rodeaba.**

**Llena tu mente de las cosas buenas,
de las cosas positivas que construyen
y deja en el ayer todas tus penas,
las negaciones que todo lo destruyen.**

**Tu hogar será de dicha,
en los tuyos hallarás el porqué de tu camino
y todo para ti será de orgullo
y tus hijos tendrán otro destino.**

**Y tú que eres soltera,
buscarás no al hombre que halague tus sentidos,
sino al alma que te comprenda más,
porque el alma hace al hombre, no el vestido.**

**La noche quedó atrás,
un nuevo día se anuncia en el dintel de tu ventana,
ya no dejes que escape tu alegría
ni que vuelva el ocaso a tu mañana.**

**Ya no vivas de ayeres, de lamentos,
ya no suenes tu nota discordante,
piensa siempre en todos tus momentos
que la vida comienza a cada instante.**

Víctor Manuel Otero

ÍNDICE	
TÍTULO	PÁGINA
I. GLOSARIO	1
II. RELACIÓN DE FIGURAS	2
III. RELACIÓN DE TABLAS	2
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 RADICALES LIBRES	4
2.1.1 Generación de radicales libres	5
2.2 PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) Y/O ESPECIES REACTIVAS DE OXIDOS DE NITRÓGENO (ERON)	5
2.2.1 Oxígeno molecular (O ₂)	5
2.2.2 Singulete oxígeno (¹ O ₂ •)	6
2.2.3 Anión Superóxido (O ₂ • ⁻)	7
2.2.4 Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	8
2.2.5 Radical hidroxilo (HO•) y óxido nítrico (NO•)	9
2.2.6 Ozono (O ₃)	11
2.3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	12
2.3.1 Enzimas Antioxidantes	12

2.3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).	13
2.3.1.2 Catalasa (CAT)	13
2.3.1.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px)	
2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos	15
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO	16
2.4.1 Adaptación al estrés oxidante	16
2.4.2 Estrés oxidativo agudo	17
2.4.3 Estrés oxidativo crónico	17
2.5 DAÑO A BIOMOLÉCULAS	18
2.5.1 Oxidación de proteínas	18
2.5.2 Oxidación de ácidos nucleicos	18
2.5.3 Proceso de Lipoperoxidación	18
2.6 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)	23
2.6.1 Clasificación clínica de la EPOC de acuerdo a la GOLD	26
2.6.2 Epidemiología de la EPOC	26
2.6.3 Factores de Riesgo	27
2.6.4 Patogénesis	28
2.7 RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.	29
2.8 ERITROCITOS	32
2.8.1 Membrana del eritrocito	33
2.8.2 Estrés oxidativo en la membrana del eritrocito.	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. HIPOTESOS	37
5. OBJETIVOS	37
5.1 OBJETIVO GENERAL	37

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	37
6. MATERIAL Y METODOS	38
6.1 CONSIDERACIONES ETICAS	38
6.2 TIPO DE ESTUDIO	39
6.3 CAPTACION DE PACIENTES	39
6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	39
6.4.1 Criterios de inclusión para pacientes EPOC	39
6.4.2 Criterios de no inclusión para pacientes con EPOC	40
6.4.3 Criterios de inclusión para el grupo Control	40
6.4.4 Criterios de no inclusión para el grupo Control	40
6.5 CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA	40
6.6 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	41
6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	43
6.8 DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DAÑO POR ESTRÉS OXIDATIVO	44
6.8.1 Biomarcadores de daño a lípidos	44
6.8.1.1 <i>Cuantificación de Materia orgánica total</i>	44
6.8.1.2 <i>Concentración de Dienos Conjugados.</i>	44
6.8.1.3 <i>Cuantificación de lipohidroperóxidos</i>	45
6.8.1.4 <i>Cuantificación de MDA por la reacción con MPI (1-methyl-2-phenylindole)</i>	46
6.8.2 Biomarcador de daño a proteínas	47
6.8.2.1 <i>Cuantificación de proteína</i>	47
6.8.2.2 <i>Cuantificación de la carbonilación de proteínas</i>	48
6.9 ANALISIS ESTADISTICO	49
7. RESULTADOS	50
7.1 DATOS DEMOGRAFICOS Y DE FUNCION RESPIRATORIA EN PACIENTES CON EPOC GOLD I, II, II Y IV.	50
7.2 DAÑO A LIPIDOS	51
7.2.1 Determinación de dienos conjugados en grupo control y en EPOC (I, II, III Y IV).	51

7.2.2 Determinación de Lipohidroperóxidos en grupo control y en EPOC (I, II, III Y IV).	52
7.2.3 Determinación de Malondialdehído en grupo control y en EPOC (I, II, III Y IV).	53
	54
7.3 DAÑO A PROTEINAS	54
7.3.1 Determinación de grupos carbonilo	55
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	59
10. PERSPECTIVAS	60
11. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	71

1. GLOSARIO

ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
$^1\text{O}_2$	Singulete oxígeno
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anión Superóxido
H_2O_2	Peróxido de Hidrógeno
HO^{\bullet}	Radical hidroxilo
NO^{\bullet}	Oxido nítrico
(O_3)	Ozono
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
LPx	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
MPI	n-metil 2-felindole
RL	Radicales Libres
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
ONOO ⁻	Peroxinitrito
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
GOLD	Iniciativa Global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

2. RELACION DE FIGURAS

Figura 1. Inicio de lipoperoxidación por la unión de radical hidroxilo y formación de dieno conjugado.

Figura 2. Formación de hidroperóxido.

Figura 3. Formación de productos finales de lipoperoxidación (4HNE = 4-cetononenal, 4HNE= 4-hidroxinonenal, MDA= malondialdehído y acroleína).

Figura 4. Membrana de eritrocito

Figura 5. Formación de aducto de Carbocianina

Figura 6. Formación de Dinitrofenilhidrazonas

Figura 7. Concentración de dienos conjugados durante el proceso de lipoperoxidación en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

Figura 8. Concentración de Lipohidroperóxidos en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

Figura 9. Concentración de malondialdehído en el grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

Figura 10. Determinación de grupos carbonilo en el grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

3. RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación clínica funcional de la EPOC de acuerdo a la GOLD

Tabla 2. Datos demográficos y de función respiratoria en pacientes con EPOC (I, II, III y IV).

1. RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una causa importante de morbilidad entre las enfermedades crónicas de todo el mundo y su prevalencia y mortalidad se incrementarán en las próximas décadas. La EPOC se caracteriza por la limitación al flujo de aire, la cual no es totalmente reversible. Esta limitación es progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones y vías aéreas, cuyo factor de riesgo más importante es la exposición a partículas nocivas y gases ^(Cano et al., 2006).

El estrés oxidante ha sido involucrado como uno de los mecanismos básicos implicados en la patogenia y progresión de la EPOC. El incremento de radicales libres afecta al pulmón y a otros sistemas, entre ellos a los eritrocitos, dificultando el transporte y la difusión de oxígeno. Por lo tanto la importancia de la EPOC se correlaciona con alteraciones estructurales de los eritrocitos, ya que la morfología y la funcionalidad eritrocitaria están directamente ligados al transporte y aporte de oxígeno a los tejidos ^(G. Celedon, et al. 2003).

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), está asociada al estrés oxidante, condición metabólica, desencadenada por un aumento en la producción de los radicales libres.

2.1 RADICALES LIBRES

Los orbitales atómicos son regiones del espacio que rodean a un núcleo y se consideran como zonas de probabilidad en las que pueden encontrarse los electrones. En un átomo cada orbital puede contener como máximo dos electrones, los cuales tienen tres números cuánticos iguales (n , l , m) y se diferencian en el cuarto número, que es el spin (s), correspondiente al giro. Los valores del giro son de $+1/2$ y de $-1/2$, dos electrones en el mismo orbital deben presentar giros antiparalelos (de $+1/2$ y $-1/2$). De acuerdo con el principio de exclusión de Pauli (no pueden existir en un átomo dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales, ya que estarían en el mismo lugar en el espacio).

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas, que en el orbital más externo de su estructura tienen a un electrón no pareado, por lo tanto les falta otro electrón para lograr su estabilidad energética, como consecuencia, el radical tiene afección por la captura de un electrón de cualquier molécula accesible, al incorporar a su

orbital un electrón de otro átomo, ocasionando que la entidad afectada quede inestable, generando una reacción en cadena. (Bergendi et al., 1999).

La característica física del radical libre se expresa en la fórmula semidesarrollada por un punto a la derecha del compuesto, como superíndice, y puede preceder a una carga (Olivares, et al 2006), por ejemplo: radical hidroxilo (HO^\bullet), y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Las especies reactivas se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células.

2.1.1 Generación de Radicales Libres

En todos los procesos metabólicos inherentes al organismo se producen pequeñas cantidades de RL, como sucede en el retículo endoplásmico. La fuente endógena de RL más importante es el sistema mitocondrial por la cadena transportadora de electrones, donde las especies reactivas de oxígeno se generan como producto secundario del metabolismo energético oxidante (Dorado M. C. 2003).

Los RL pueden formarse por tres mecanismos fundamentales:

- a) Por el rompimiento homolítico de un enlace covalente de una molécula. En este caso cada fragmento resultante retiene un electrón previamente apareado (de los dos que formaban el enlace).
- b) Por la pérdida o adición de un electrón a una molécula estable.

La fisión homolítica y la transferencia de electrones se realizan por uno de los siguientes mecanismos:

a) absorción de energía de diversos tipos, como la radiación ionizante, ultravioleta, visible y térmica.

b) por reacciones de óxido-reducción, en las que se transfieren de manera no enzimática electrones, como es el caso de reacciones en las que intervienen metales de transición como son el hierro y cobre, hacia el oxígeno contenido en moléculas estables.

c) reacciones catalizadas por enzimas, entre las que destacan la formación de óxido nítrico por la óxido nítrico sintasa, la de anión superóxido por el complejo enzimático de la membrana citoplásmica de los fagocitos, denominado NADPH oxidasa involucrada en el estallido respiratorio, así como la formación de algunas especies reactivas del oxígeno como es el caso de la formación de peróxido de hidrógeno, por la superóxido dismutasa.

2.2 PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) Y/O ESPECIES REACTIVAS DE OXIDOS DE NITRÓGENO (ERON)

2.2.1 Oxígeno molecular (O₂)

La molécula de oxígeno es considerada un birradical por el hecho de que sus electrones están distribuidos de tal forma que dos de ellos no están

pareados. La toxicidad del O_2 se basa en la formación de las ERO.

Entre las principales ERO producidas de forma endógena se encuentran: singulete de oxígeno, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxilo, y la más importante producida de forma exógena es el ozono ^(Cleeter et al., 2001).

2.2.2 Singulete de oxígeno ($^1O_2^\bullet$)

El singulete de oxígeno ($^1O_2^\bullet$) se forma cuando uno de los dos electrones libres del O_2 capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre, pero en diferente orbital (Py y Pz). Se forma, cuando algunos pigmentos biológicos se iluminan por excitación electrónica en presencia de oxígeno. El singulete tiene gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo lípidos de membrana. Se forma en cantidades importantes en tejidos y órganos sometidos a radiaciones ionizantes ^(Yu, 1994).

Otra fuente del singulete son los fagocitos, los cuales contienen a la enzima mieloperoxidasa (MPO), hemoproteína perteneciente a la familia de las peroxidases, es la proteína más abundante en los neutrófilos (polimorfonucleares), durante el estallido respiratorio presenta dos actividades principales: halogenación y lipoperoxidación, en la primera, esta enzima cataliza la formación de ácido hipocloroso, que es un importante agente bactericida reactivo con diferentes moléculas incluyendo los grupos amino libres (RNH_2) para formar cloraminas.

2.2.3 Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

El $O_2^{\bullet-}$ es el producto de la incorporación de un electrón a la molécula de oxígeno, el cual lo convierte en un radical con carga negativa.

Las principales fuentes de $O_2^{\bullet-}$ son:

- c) La reacción de varias moléculas con el oxígeno por ejemplo; la adrenalina, la dopamina, el tetrahidrofolato y citocromos.
- d) La xantina oxidasa, genera $O_2^{\bullet-}$ al reducir O_2 a H_2O durante el catabolismo de las bases púricas ^(Desco et al., 2002).
- e) La NADPH oxidasa, complejo enzimático inducido por los polimorfonucleares, producido durante el estallido respiratorio (aumento súbito del consumo de oxígeno), ^(Babior et al., 2002) cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 con la formación del radical superóxido, en los procesos fagocíticos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos), como parte del mecanismo empleado para destruir organismos extraños, generalmente bacterias ^(Cohen et al., 1998).
- f) La autoxidación de la coenzima Q semireducida (ubisemiquinona) en la cadena transportadora de electrones localizada en el interior de la membrana. La mayor parte de los RL producidos por la mitocondria provienen de esta coenzima ^(Sohal et al., 1989).

2.2.4 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Estrictamente el H₂O₂ no es un radical libre porque no posee electrones no apareados. El H₂O₂ se forma por la dismutación del anión superóxido, catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). En medio acuoso el anión superóxido se dismuta de manera espontánea generando H₂O₂ y oxígeno molecular. La vida media del H₂O₂ depende de la presencia o ausencia de las enzimas encargadas de removerlo del medio (Bannister & Rotillo, 1987), como la catalasa o la glutatión peroxidasa.

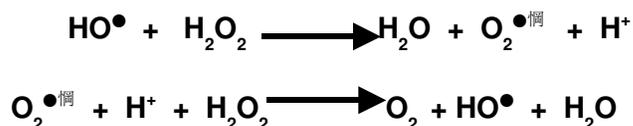
El H₂O₂ es un agente que puede difundir a través de las membranas celulares al espacio extracelular, en donde existen pocos mecanismos de defensa antioxidante y puede participar en la formación del radical hidroxilo. A pesar de no ser un radical, es de vital importancia en biología, ya que en presencia de metales de transición reducidos como cobre o hierro da lugar a la reacción de Fenton (reacción 1) con la producción del radical hidroxilo (HO•).

Reacción 1



Haber, Wilatatter y Weiss describen que el HO• en presencia de H₂O₂ forma O₂•⁻ el cual, ante un exceso de peróxido de hidrógeno da lugar a la generación de una cantidad adicional de radical hidroxilo (reacción 2).

Reacción 2



El conjunto de las reacciones descritas, constituye el ciclo de **Haber-Weiss** (Koopenol, 2001). La coexistencia del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, en un medio biológico que inevitablemente contienen hierro, es muy peligroso ya que el (HO[•]) formado, es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos (Koopenol, 2001).

2.2.5 Radical hidroxilo (HO[•]) y óxido nítrico (NO[•])

El radical hidroxilo puede formarse también al reaccionar el O₂^{•-} y el H₂O₂ en un medio biológico que contiene hierro o cobre. El HO[•] es un oxidante en extremo reactivo, interacciona a una velocidad muy alta con casi todas las moléculas biológicas: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, formando entre otros productos, radicales libres de aquellas moléculas con las que reaccionó. Tiene una vida media de 10⁻⁹ segundos, y también puede generarse por la ruptura homolítica del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido de hidrógeno (Janssen et al., 1993).

El radical HO[•] también se produce por las radiaciones provenientes del medio, ya

sean naturales, como las radiaciones cósmicas o del gas radón, o bien de otras fuentes creadas por el hombre. Las radiaciones electromagnéticas con baja longitud de onda pueden romper el agua y generar radicales HO•.

Por otra parte, el O₂•⁻ puede reaccionar con el óxido nítrico (NO•), éste es un RL biatómico, de vida media corta y sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Gow et al., 1998). Debido a que el NO• posee un electrón desapareado, es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular (O₂) y anión superóxido (O₂•⁻). De hecho, las reacciones del NO• con el O₂ resultan en la generación de oxidantes reactivos tales como el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) (Albert et al., 1997). Al reaccionar el NO• con O₂•⁻ forma la especie reactiva peroxinitrito (ONOO⁻), el cual se escinde en una molécula de radical hidroxilo y una de bióxido de nitrógeno (reacción 3).

Reacción 3



En condiciones patológicas el NO• parece mediar sus efectos a través de diversas reacciones con algunas ERO para dar lugar a la formación de ERON que pueden reaccionar de manera específica e irreversible con residuos que son críticos para el funcionamiento de las enzimas de la cadena respiratoria, lo que culmina con un decaimiento en la producción de energía y de todos los procesos que dependen de ella (Cleeter et al., 2001).

2.2.6 Ozono (O_3)

A pesar de que el ozono no es producido de manera fisiológica, es una ERO proveniente de fuentes exógenas, la cual está involucrada en el desarrollo de diversas enfermedades.

La luz ultravioleta y las descargas eléctricas rompen los dos enlaces covalentes en la molécula del O_2 produciendo oxígeno atómico (O), que se combina inmediatamente con el O_2 para producir el ozono (O_3). Este gas en la estratosfera evita que la luz ultravioleta llegue a la superficie terrestre, impidiendo el daño a los organismos por este tipo de radiación. Sin embargo, el O_3 también se puede generar a nivel de la superficie terrestre por efecto de la luz sobre el di-oxígeno de nitrógeno (NO_2). Esta molécula se genera por la combustión de la materia orgánica, principalmente en los automotores y en presencia de algunos hidrocarburos contaminantes de la atmósfera. El NO_2 se descompone en NO y O y este último reacciona con el O_2 para formar el O_3 , que a su vez puede reaccionar con biomoléculas como son los lípidos y las proteínas, e incluso adicionalmente puede generar otras especies reactivas.

El organismo cuenta con sistemas antioxidantes capaz de contrarrestar el daño producido por las ERO/ERON.

2.3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son los sistemas reguladores de la actividad de las especies reactivas y se define como aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidorreducción. Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras, de las cuales la más utilizada es la que establece las diferencias de acuerdo con la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos.

2.3.1 Enzimas Antioxidantes

Las defensas antioxidantes consisten primeramente en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos. Este proceso lo lleva a cabo el sistema citocromo-oxidasa, que reduce más del 90% del oxígeno en el organismo humano.

Además se ha descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar a las ERO por diferentes mecanismos, como es el caso de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otras.

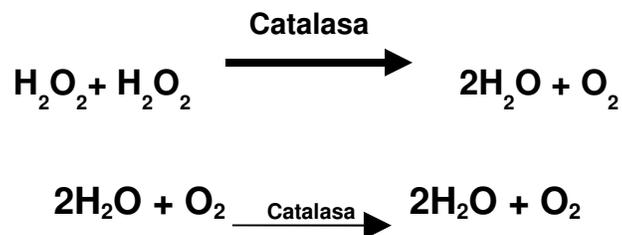
2.3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) se encarga de mantener concentraciones no-tóxicas de $O_2^{\bullet-}$ al catalizar la reacción de dismutación de dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 (Imlay and Fridovich, 1991). Existen diferentes isoformas de esta enzima SOD dependiendo de los iones metálicos que contienen en su centro activo: Cu,ZnSOD, FeSOD, MnSOD, Fe/MnSOD y NiSOD. La reacción catalizada por estas enzimas se realiza en dos pasos, cada uno de los cuales supone la entrada en el centro activo de una molécula de $O_2^{\bullet-}$. A pesar de la carga negativa de $O_2^{\bullet-}$, la entrada está potenciada porque el propio ión metálico genera una carga neta positiva que atrae electrostáticamente a su sustrato (Miller, 2004). En las células eucariotas existen dos isoformas de la enzima SOD: MnSOD y Cu,ZnSOD. MnSOD es una enzima tetramérica de localización mitocondrial, que contiene un ión de Mn (III) por subunidad (Fridovich, 1998). Por otra parte, la Cu,ZnSOD es una enzima dimérica de localización citoplasmática que contiene en su centro activo un ión de Zn(II) cuyo papel es esencialmente estructural y uno de Cu(II) cuya oxidación/reducción es importante para la actividad catalítica de la enzima. Ambos iones metálicos se encuentran ligados a un imidazolato que es importante para la conducción de protones.

2.3.1.2 Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima antioxidante, la cual cataliza la transformación de peróxido de hidrógeno a agua (reacción 4). En mamíferos esta enzima está presente en hígado y riñón en altas concentraciones y en bajas concentraciones en tejido conectivo ^(Nakashima et al., 1989). En las células se ha localizado en el citosol, mitocondrias y organelos subcelulares como los peroxisomas (abundantes en las células epiteliales del túbulo proximal renal), mientras que en los eritrocitos la enzima existe en una forma soluble.

Reacción 4



2.3.1.3 Glutación peroxidasa (GSH-Px)

Las peroxidases son enzimas que catalizan la reducción de H_2O_2 por diversos donadores de electrones. Se han identificado hasta ahora cuatro tipos de GSH-Pxs, todas dependientes de selenio ^(Hill et al., 1992).

- a) La enzima citosólica (cGSH-Px) tiene la función del almacenamiento de elementos traza en condiciones en que se presentan cantidades elevadas

de H_2O_2 o hidroperóxidos de lípidos que son producidos en el citosol (Burk, 1991).

- b) La enzima plasmática (pIGSH-Px) es la responsable de la actividad de peroxidasa en el plasma, se cree que juega un papel clave en el sistema de defensa antioxidante del plasma (Maddipati & Marnett, 1987).
- c) La enzima gastrointestinal (gIGSH-Px), el ARNm para gIGSH-Px se ha encontrado en hígado de humano y colon, pero no en otros tejidos. En ratas el ARNm se ha detectado sólo en el tracto gastrointestinal. La localización de esta isoenzima de glutatión peroxidasa sugiere que tiene un papel en la protección contra los efectos adversos de los hidroperóxidos de la dieta.
- d) La enzima presente en los fosfolípidos (PLGSH-Px) es abundante en los testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (Roveri et al., 1992). También tiene un sitio de fosforilación, el cual puede tener un papel en la regulación de la actividad de la enzima.

Las cuatro isomorfos catalizan la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), el cual, a su vez, es reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH impidiendo así que se agoten las reservas de GSH.

2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos, se pueden clasificar como endógenos (los que sintetiza el organismo) o como exógenos (los que se adquieren en la dieta).

Entre los exógenos se encuentran: el glutatión en su forma reducida (GSH), ácido úrico, bilirrubina, albúmina, etc. Y entre los endógenos se encuentran: ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E), algunos minerales como selenio, zinc, manganeso, estos son esenciales para la defensa contra el daño oxidante debido a que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes. (Krinski, 1992).

Cuando el balance oxidante/antioxidante se pierde, se pueden generar daños a biomoléculas, generando estrés oxidante.

2.4 ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante, se define como el desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes a favor de un daño potencial (William, 2000). Con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidante puede dividirse en tres etapas o niveles de evolución o intensidad (adaptación, agudo y crónico), tomando en consideración, las características del daño estructural y funcional de las diversas biomoléculas, así como al tiempo de exposición a las ERO.

2.4.1 Adaptación al estrés oxidante

La adaptación es la respuesta de la célula o del organismo para equilibrar por

medio de procesos de sobre expresión genética y activación enzimática la sobreproducción de especies reactivas que ya han superado a los sistemas antioxidantes estableciendo las condiciones de estrés oxidante. El resultado de la adaptación, es una protección parcial o total contra el daño el cual no es cuantificable e incluso puede llegar a crear una condición de resistencia a niveles intensos y constantes. En esta etapa ya existe el estrés oxidante dado que se superaron los mecanismos antioxidantes. En contraste, cuando no es posible lograr esta adaptación o se agota la sobreexpresión antioxidante, se presenta el daño que puede ser de intensidad y duración muy variable.

2.4.2 Estrés oxidante agudo

Proceso mediado principalmente por las ERO; como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, (ovulación, mecanismos de defensa etc.), pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suele acompañar también a procesos crónicos.

2.4.3 Estrés oxidante crónico

Proceso mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente

liberación de una segunda generación de productos de oxidación que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular.

El estrés oxidante genera un daño directo a biomoléculas, así como el incremento de biomarcadores de estrés oxidante con el desarrollo de limitación del flujo aéreo.

2.5 DAÑO A BIOMOLÉCULAS

2.5.1 Oxidación de proteínas

La exposición de las proteínas a los sistemas generadores de radicales libres conduce a modificaciones de su estructura terciaria que, a su vez, puede dar lugar a pérdida de la función proteica. Las modificaciones estructurales de las proteínas, así como de los lípidos, pueden manifestar una capacidad de transferencia del daño a otras moléculas.

El biomarcador de daño a proteína más utilizado es el ensayo de grupos carbonilos (Dalle-Donne et al., 2003, Amici et al., 1989). La exposición de los grupos carbonilos puede surgir como resultado de; a) el ataque directo de los radicales, b) la interacción con metales de transición, c) la glicación o, d) por la formación de aductos entre proteínas y algunos productos de la lipoperoxidación (malondialdehído, 4-hidroxi-nonenal).

2.5.2 Oxidación de ácidos nucleicos

La interacción de las especies reactivas con los ácidos nucleicos puede conducir al rompimiento de una cadena de polinucleótidos, eludiendo al sistema de reparación y al presentar una mutación antes de la replicación (Luczaj, 2003). La desoxirribosa del DNA es también blanco para el ataque del HO•. El centro preferente de ataque es el C-4, en el que presenta una sustracción de un hidrógeno, conduciendo a un arreglo que eventualmente permite la pérdida de la base y el rompimiento de la cadena con dos tipos de terminaciones: fosforilo y fosfoglicolato (Fraga et al., 1990, Olivares et al., 2006).

El daño que puede causar el estrés oxidante en los organismos se ha vinculado ha diversos procesos patológicos: como estados de isquemia y reperfusión, trastornos neurológicos, anomalías del sistema vascular, e inflamación entre otros.

2.5.3 Proceso de Lipoperoxidación

El proceso de lipoperoxidación, comienza cuando un radical hidroxilo ejerce un ataque electrofílico monoelectrónico sobre el enlace carbono-hidrógeno, que es más susceptible por ser vecino a un doble enlace carbono-carbono. El carbono queda como radical orgánico y rápidamente se establece un reacomodo electrónico a partir del doble enlace vecino, dando lugar a un dieno conjugado

(Figura 1) y a la formación de un radical orgánico que es atacado por oxígeno molecular.

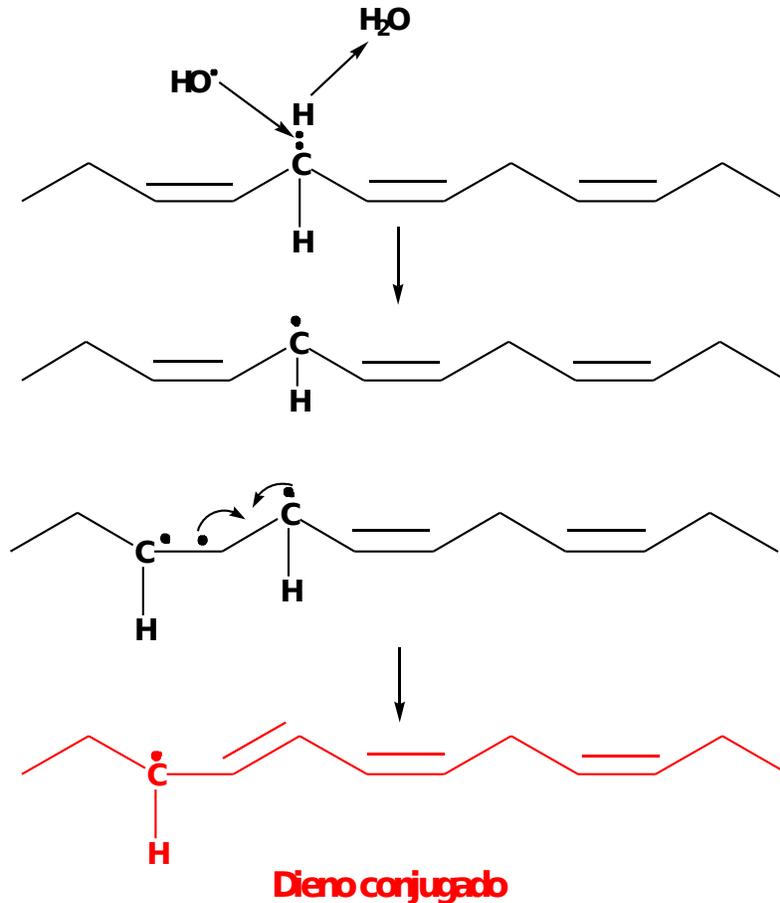


Figura 1. Inicio de lipoperoxidación por la union de radical hidroxilo y formacion de dieno conjugado.

El radical peroxilo formado, sustrae un hidrógeno de una cadena vecina formando en ella un nuevo radical, quedando la primera cadena de lipoperoxidación con un radical hidroperóxido, que en presencia de un ion ferroso forma un ión hidróxido y un alcoxilo orgánico, o también puede seguir las reacciones que conducen a la formación de un éster interno (Figura 2).

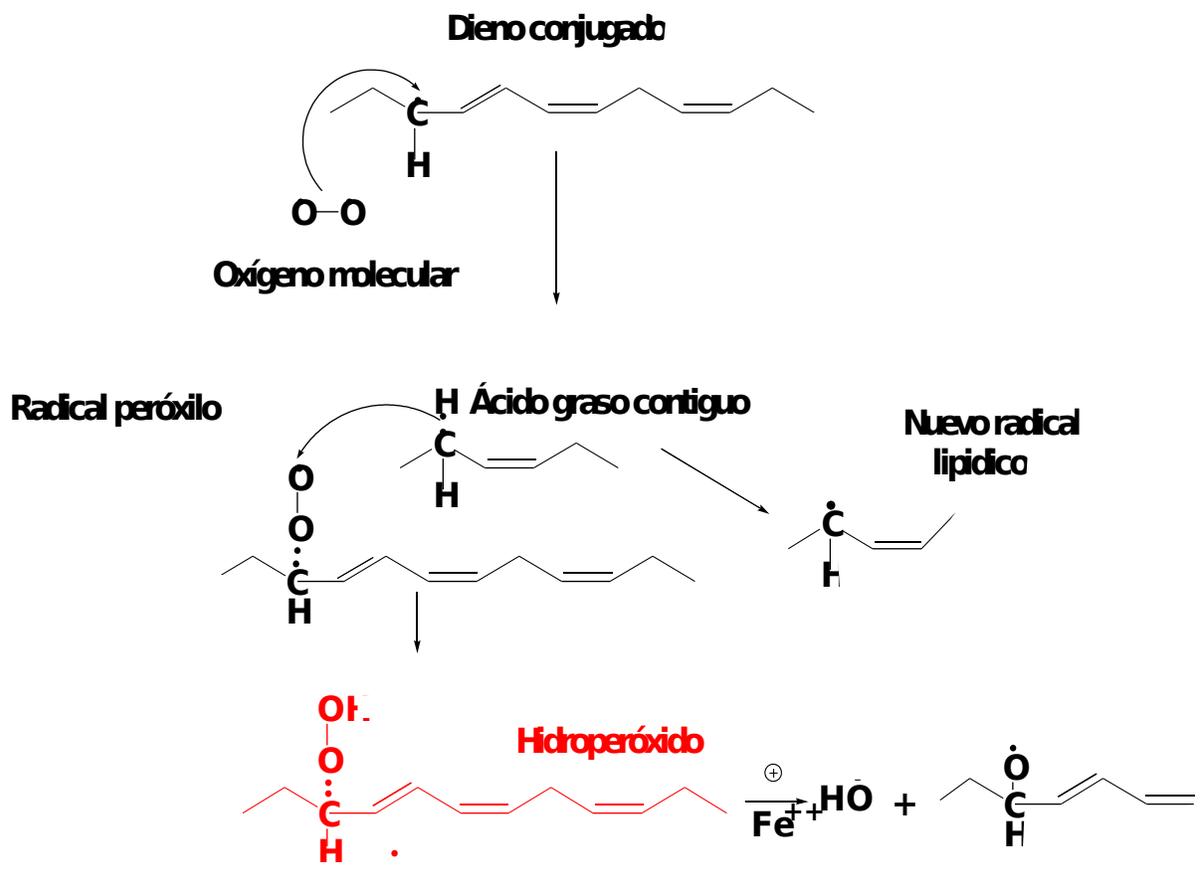


Figura 2. Formación de hidroperóxido.

Los productos finales de la lipoperoxidación son varios aldehídos que incluyen al malondialdehído (MDA), acroleína y 4-hidroxinonenal entre otros (Hicks 2007). (Figura 3)

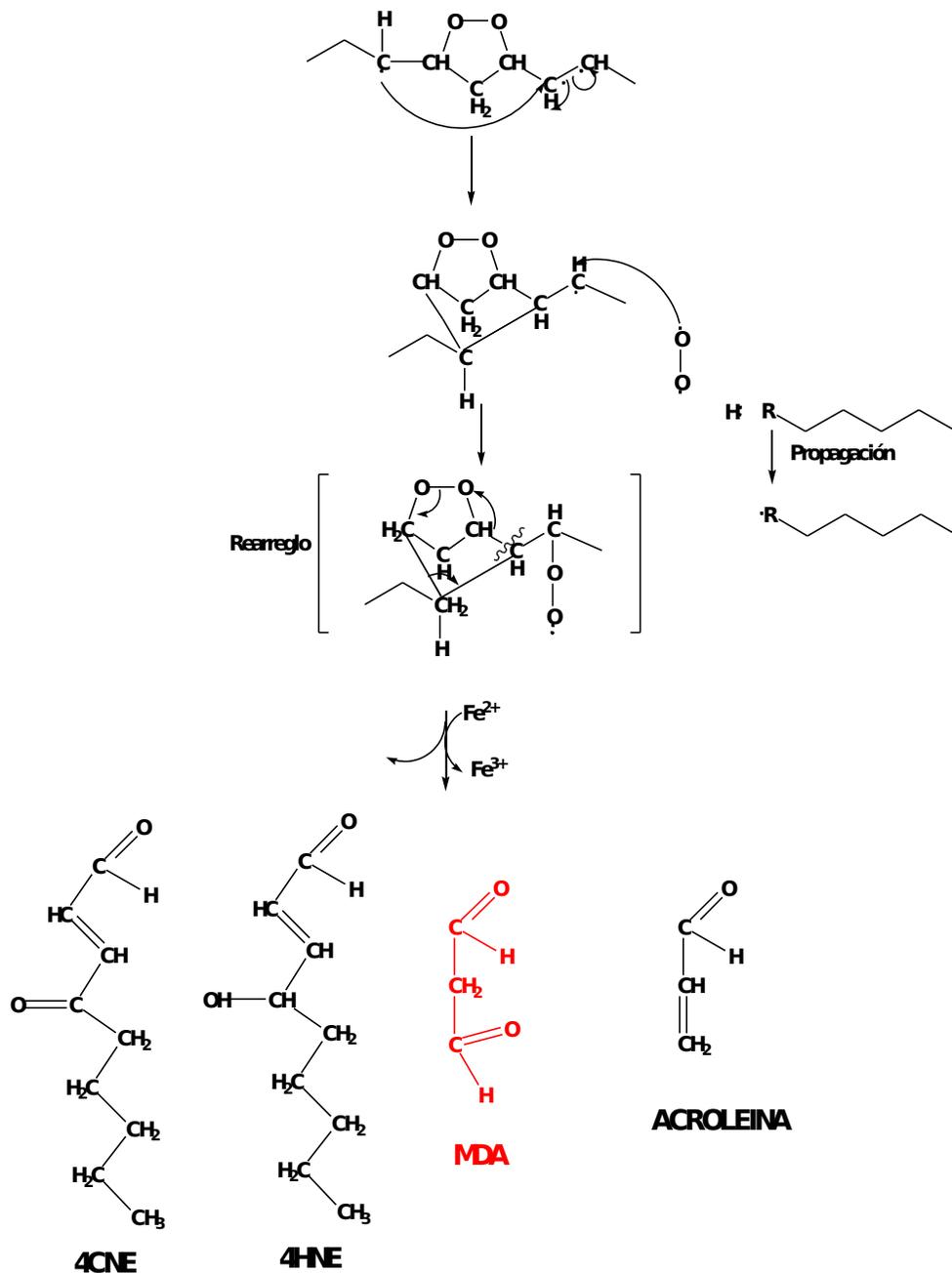


Figura 3. Formación de productos finales de lipoperoxidación (4HNE = 4-cetnonenal, 4HNE= 4-hidroxinonenal, MDA= malondialdehído y acroleína).

El daño a lípidos se vincula con la etiología de diversas enfermedades o lesiones estructurales como aterosclerosis, artritis reumatoide, asma, cáncer, envejecimiento celular y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) ^(Hicks)

2.6 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una enfermedad prevenible y tratable con algunos efectos extra pulmonares significativos que pueden contribuir a la gravedad de pacientes individuales. Su componente pulmonar se caracteriza por una limitación del flujo aéreo que no es completamente reversible. La limitación del flujo aéreo es usualmente progresiva y asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas nocivas o gases.

La EPOC es un problema sanitario de primer orden debido a su importante morbimortalidad en quienes la padecen. Según la GOLD (Global Initiative for the Diagnosis) se define como una enfermedad caracterizada por obstrucción crónica del flujo aéreo, que habitualmente es progresiva y se asocia a una respuesta inflamatoria anormal por la inhalación de partículas o gases tóxicos ^(Borja G. 2007).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) está constituida por la bronquitis crónica y el enfisema pulmonar. Es más frecuente en mayores de 45 años y se caracteriza por obstrucción bronquial y destrucción del parénquima pulmonar en los casos de enfisema.

A pesar de estos hechos y de la enorme importancia tanto de la incidencia de la EPOC como del consumo de recursos que genera, la investigación sobre los mecanismos celulares y moleculares, así como sobre nuevos tratamientos para la

enfermedad, no se ha desarrollado de forma importante hasta las últimas dos décadas, probablemente debido a que no se comprendía la naturaleza inflamatoria de la enfermedad y, cuando se comprendía se interpretaba como similar a la observada en el asma .

Las alteraciones histopatológicas que conducen a la limitación del flujo respiratorio de la EPOC están constituidas por una mezcla variable de inflamación de las vías aéreas periféricas y de destrucción de las paredes alveolares con aumento de tamaño de los espacios aéreos.

La inflamación de las vías aéreas periféricas menores de 2 mm de diámetro, los bronquiolos corresponde a una bronquiolitis crónica obstructiva caracterizada por:

- ❖ Inflamación de la mucosa con engrosamiento por edema, e infiltración celular.
- ❖ Metaplasia e hiperplasia de las células calciformes con producción de tapones mucosos que aumentan la obstrucción bronquiolar.
- ❖ Fibrosis cicatrizal
- ❖ Acúmulos de macrófagos que estarían ligados a la remoción de material particulado del humo del cigarrillo.
- ❖ En etapas avanzadas de la enfermedad se observa además acúmulos linfoides que tendrían una participación activa en la perpetuación de la

inflamación de los bronquiolos a través de la liberación de mediadores, y fibrosis bronquiolar que fija y acentúa la obstrucción.

Las alteraciones funcionales más importantes son:

- ❖ La limitación del flujo espiratorio que se evalúa con la medición del VEF1 en la espirometría, el cual es un indicador accesible y mejor estandarizado para la demostración y evaluación de la limitación del flujo aéreo llamado también reducción espirométrica del VEF1.
- ❖ Hiperinflación pulmonar dinámica con aumento de la capacidad residual, que puede evaluarse indirecta y fácilmente mediante la capacidad inspiratoria.
- ❖ La alteración del intercambio gaseoso evaluable mediante la medición de los gases arteriales.

2.6.1 Clasificación clínica de la EPOC de acuerdo a la GOLD

La espirometría es la prueba diagnóstica que evalúa la presencia y severidad de la obstrucción bronquial. Los parámetros que mide son:

- CVF (Capacidad Vital Forzada)
- VEF1 (Volumen espiratorio forzado en el primer segundo en litros y porcentaje).
- VEF1/CVF (Relación entre el volumen espiratorio forzado en el primer

segundo y la capacidad vital forzada en %)

La relación que existe entre VEF1/CVF confirma la obstrucción de la vía aérea (menor de 70) y el FEV el grado. Es importante mencionar que se debe realizar la espirometría pre y post broncodilatador y es la postbroncodilatador la que se toma en cuenta para diagnosticar la enfermedad.

Tabla 1. Diagnóstico y clasificación de la EPOC.

Severidad de la EPOC	Estadio 0 En Riesgo	Estadio I Leve	Estadio II Moderado	Estadio III Severo	Estadio IV Muy Severo
Síntomas	Tos crónica y expectoración	Tos crónica y expectoración	Tos crónica y expectoración	Tos crónica expectoración y disnea	Tos crónica expectoración y disnea
Espirometría	Normal	VEF1/CVF <70%	VEF1/CVF <70%	VEF1/CVF <70%	VEF1/CVF <70%
Severidad de la obstrucción %	VEF1 normal	VEF ≥ 80%	VEF ≥ 50% <80%	VEF ≥ 30% <50%	VEF <30%

2.6.2 Epidemiología de la EPOC

La EPOC es una enfermedad que va en aumento. Los factores de riesgo más frecuentes causantes de la enfermedad en México son, el tabaquismo y la exposición a la quema de biomateriales y carbón. La prevalencia es variable de acuerdo con la gravedad. En el estadio 0 (riesgo de EPOC) fue del 23%, mientras que la etapa más avanzada (estadio IV); del 0.3%.

La prevalencia de la EPOC en países desarrollados va del 3% al 6% en sujetos mayores de 50 años. En Estados Unidos, 15 millones de sujetos padecen la enfermedad. En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la EPOC se ubicó en el cuarto lugar de morbilidad y mortalidad en el 2001 (Cano et al., 2006).

Actualmente la EPOC ocupa el cuarto lugar de muertes en el mundo (Malarcher AM., et al 1997), y en México se ubicó en el 6° lugar en el año 2000 (Estadísticas vitales., 1998). Estudios recientes muestran una prevalencia igual en hombres y mujeres (Gold, 2005).

En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), fue la cuarta causa de consulta externa de primera vez y se ubicó en el 5to lugar de morbilidad y mortalidad hospitalaria en el año 2005.

2.6.3 Factores de Riesgo

El factor de riesgo más frecuente es el tabaquismo. En México, y en países como Nepal, Nueva Guinea y Colombia, la exposición al humo de leña es causa de EPOC. La inhalación en el trabajo de polvos, gases, humos y sustancias químicas constituye otros factores de riesgo. En Estados Unidos la causa laboral de la EPOC fue de 19%. Las industrias más frecuentes causantes de la enfermedad son las manufactureras, como la del caucho, plástico, papel, construcción, fabricas textiles y elaboración de productos alimenticios.

Con respecto a los factores de riesgo, debe interrogarse la intensidad de la

exposición, ya que a mayor exposición el riesgo aumenta.

El hecho de que en una mayoría de los pacientes el desarrollo de la enfermedad sea consecuencia del consumo prolongado de tabaco, la reacción inflamatoria al humo del tabaco aparece en los fumadores, pero solo un 15- 20 % desarrollará la enfermedad. El humo del tabaco es una fuente de radicales libres, calculándose una cantidad de 10^{17} moléculas oxidantes por cada inhalación de un cigarrillo. Por lo tanto existe cada vez más evidencia de la implicación del estrés oxidante en la patogenia de la EPOC. Se ha demostrado un aumento de peróxido de hidrógeno en el condensado respiratorio de pacientes con EPOC. Sin embargo este estrés oxidante no solo proviene del tabaco, sino que además los macrófagos alveolares y los neutrófilos de los fumadores liberan más radicales de oxígeno que los de los no fumadores (Rahaman I, MacNee W 1996).

La EPOC presenta destrucción del parénquima pulmonar e inflamación de la vía aérea. La evolución del proceso inflamatorio depende de muchos factores, entre ellos, el control a nivel genético.

2.6.4 Patogénesis

En pacientes con EPOC se han observado alteraciones de células inflamatorias circulantes, neutrófilos y linfocitos. Debido a su participación en la respuesta inflamatoria (Hoffmeyer et al., 2009). Los neutrófilos circulantes responden al estímulo de un factor quimiotáctico con mayor respuesta quimiotáctica y tienen mayor capacidad proteolítica. Esto sugiere que, aunque se produzcan cantidades normales de

factores quimiotácticos en el pulmón, la respuesta de los neutrófilos puede ser excesiva y, con el tiempo, provocar una mayor acumulación de estas células en el órgano y mayor destrucción tisular. Otros estudios han demostrado mayor expresión de la molécula de adhesión Mac-1 en los neutrófilos circulantes de pacientes con EPOC y mayor producción de especies reactivas de Oxígeno (ERO) a través del estallido respiratorio. Uno de los primeros procedimientos que tiene lugar en la respuesta inflamatoria es un cambio cualitativo en las interacciones entre neutrófilos circulantes y endotelio vascular. En condiciones normales, los neutrófilos interaccionan poco con el endotelio pues determinados factores hemodinámicas e interacciones electrostáticas tienden a mantenerlos lejos de la pared vascular (Bathoorn et al., 2009). Oponiéndose a estas fuerzas dispersantes, la expresión de moléculas de adhesión específicas en la superficie de neutrófilos y endotelio favorece la adhesión leucocitaria (Morgan and Rashid et al., 2009), que permitirá que estos neutrófilos atraviesen el endotelio vascular y lleguen al foco inflamatorio.

La inflamación sistémica asociada a la EPOC puede ocasionar la aparición de algunos cuadros de anemia (Schols and Wouters et al., 2000). En los últimos años se ha demostrado que la EPOC, acarrea muchos efectos extrapulmonares, entre los que destacan la pérdida de masa y la disfunción muscular.

2.7 RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS OXIDANTE Y LA ENFERMEDAD

PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.

Entre las consecuencias más directas del estrés oxidante en los pulmones se encuentran daños en los epitelios que recubren los espacios aéreos, en células de tejidos y en el endotelio vascular. Experimentalmente, se ha mostrado que el estrés oxidante causa un aumento de permeabilidad epitelial asociado a una depleción de glutatión, una de las principales moléculas reductoras^(Li XY. Et al 1996), así como discinesia ciliar en el epitelio respiratorio^(Feldman et al. 1994). Se ha observado, también, una correlación entre el aumento de los marcadores de estrés oxidante y la apoptosis de células endoteliales^(Tuder RM. Et al 2003) y, la producción de un fenotipo de senescencia en los fibroblastos, caracterizado por una pérdida de la capacidad de división celular y de resistencia a la apoptosis^(Nyunoya T. Et al 2006). En consecuencia, los fibroblastos son incompetentes para reparar el daño tisular asociado al desarrollo del enfisema. En los pulmones de pacientes con EPOC existen, asimismo, poblaciones de neutrófilos retenidos como consecuencia de una capacidad de deformación limitada, que resulta de un aumento de polimerización de actina debida a estrés oxidante, que se revierte mediante el uso de antioxidantes^(Drost EM. Et al 1992). Los neutrofilos retenidos son activados, liberan ROS y proteasas, y contribuyen a la destrucción de la pared alveolar. Los radicales oxidantes inducen, asimismo, la liberación de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, como la IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF-)^(Keatings VM. Et al 1996), y activan mediadores de señalización intracelular y factores de transcripción

reguladores de la expresión de genes implicados en la inflamación, como el factor nuclear β (TNF- β), la proteína activadora 1 (AP-1), las cinasas ERK (extracellularly regulated kinase) y JNK (N-terminal c-Jun kinase), y las rutas de la proteincinasa activada por p3862.

Existen una serie de estudios que han involucrado al estrés oxidante con circunstancias que contribuyen a la aparición de la inflamación.

1.- Elemento facilitador del reclutamiento de los neutrófilos en el árbol vascular pulmonar. El lecho pulmonar tiene un diámetro medio de 5 μ m por el contrario el de los neutrofilos es de 7 μ m. Esta situación obliga a un “encogimiento-deformidad” de estas células para atravesar el lecho vascular pulmonar. Esta acción parece que es inhibida a un ambiente oxidante, facilitándose de esta manera el secuestro de los neutrofilos a nivel pulmonar.

2. Se incrementa la actividad de factores de transcripción tales como el factor nuclear kB (TNF-kB), proteína activadora 1 (AP- 1). Estas moléculas actúan estimulando la transcripción de genes proinflamatorios favoreciendo de esta forma la génesis de citocinas, tales como IL-8, que contribuyen a perpetuar el estado inflamatorio.

3. Se ha involucrado el papel del estrés oxidante en el remodelado de la

cromatina nuclear. La acetilación de las histonas (mediante la enzima histona acetil transferasa) abriría este armazón, y así el DNA sería mucho más susceptible a la acción de los factores de transcripción, para favorecer así la transcripción de genes pro-inflamatorios.

El estrés oxidante ha sido involucrado como uno de los mecanismos básicos implicados en la patogenia y progresión de la EPOC. El incremento de radicales libres afecta al pulmón y a otros sistemas, entre ellos a los eritrocitos, dificultando el transporte y la difusión de oxígeno. Por lo tanto la importancia de la EPOC se correlaciona con alteraciones estructurales de los eritrocitos, ya que la morfología y la funcionalidad eritrocitaria están directamente ligados al transporte y aporte de oxígeno a los tejidos ^(G. Celedon, et al. 2003).

2.8 ERITROCITOS

Los eritrocitos son responsables del transporte de oxígeno, suelen tener un diámetro de 6.5 a 8.5 μ m y poseen una forma biconcava, apareciendo más pálidos en su centro y más oscuros en la periferia. La forma bicóncava maximiza su relación superficie/volumen y facilita de este modo el intercambio de oxígeno. El color rojo brillante es debido a que contiene hemoglobina, la cual transporta al

oxígeno. A pesar de la falta de organelos, los eritrocitos son metabólicamente activos y obtiene energía mediante el metabolismo anaeróbico de la glucosa y mediante la generación de ATP gracias a la derivación de la hexosa monofosfato. Funcionalmente los eritrocitos son muy deformables y son capaces de encogerse y pasar por pequeños vasos sanguíneos hasta de 3 a 4 μ m de diámetro. La membrana celular se apoya en una red que contiene actina y espectrina que es la responsable del mantenimiento de su forma biconcava característica.

Tienen una vida corta de unos 100 a 120 días en la circulación. El eritrocito maduro es incapaz de sintetizar nuevas enzimas que reemplacen a las que se hayan perdido durante el metabolismo normal.

La reducción de la eficiencia de los mecanismos de bombeo de iones tal vez sea el factor más importante que influye en el envejecimiento de este tipo de célula, haciéndose ésta cada vez menos deformable.

El vaso, el hígado y la médula ósea son capaces de eliminar los eritrocitos viejos y defectuosos (Stevenson 2004).

2.8.1 Membrana del eritrocito

La membrana del glóbulo rojo es la responsable de las propiedades mecánicas y de la mayoría de las funciones fisiológicas de la célula ^(Berga L. et al 1983). Está formada por una bicapa lipídica plana, donde predominan en el 80% los fosfolípidos y el

colesterol y en menor medida los glicolípidos aminofosfolípidos, distribuidos asimétricamente. Se encuentran embebidas parcial o totalmente en ella las proteínas integrales de la membrana, unidas fuertemente por enlaces apolares. Su libre desplazamiento a través de esta bicapa contribuye a mantener su fluidez (Delaunay J. 1983). Las proteínas periféricas interactúan entre sí para formar una malla o enrejado que recubre la cara interior de la doble capa de fosfolípidos y son las responsables de la estabilidad y las propiedades viscoelásticas de la membrana (Scriver SR. et al 1997). Entre estas proteínas se destacan la espectrina (Sp), la ankirina (banda 2.1, 2.2, 2.3 y 2.6), la banda 4.1, 4.2, 4.9, la aducina, la tropomiosina y la banda 7. Otras proteínas periféricas se disponen hacia la cara exterior de la bicapa lipídica y ellas son fundamentalmente antígenos de grupo sanguíneo (Scriver SR. et al 1997).

La banda 3 constituye un elemento central de un macrocomplejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito (G. Celedon, et al. 2003). El dominio citoplásmico N-terminal de la banda 3 une enzimas glicolíticas, hemoglobina y hemicrones, que pueden inducir la agregación de la banda 3 y el recambio celular (Zhang D. et al. 2000). Una función fundamental del dominio N-terminal de la banda 3 es el anclaje de la membrana eritrocitaria al citoesqueleto subyacente (Lux SE. et al 1995). Por lo tanto la banda 3 constituye el elemento central de un macro complejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito. (Figura 4)

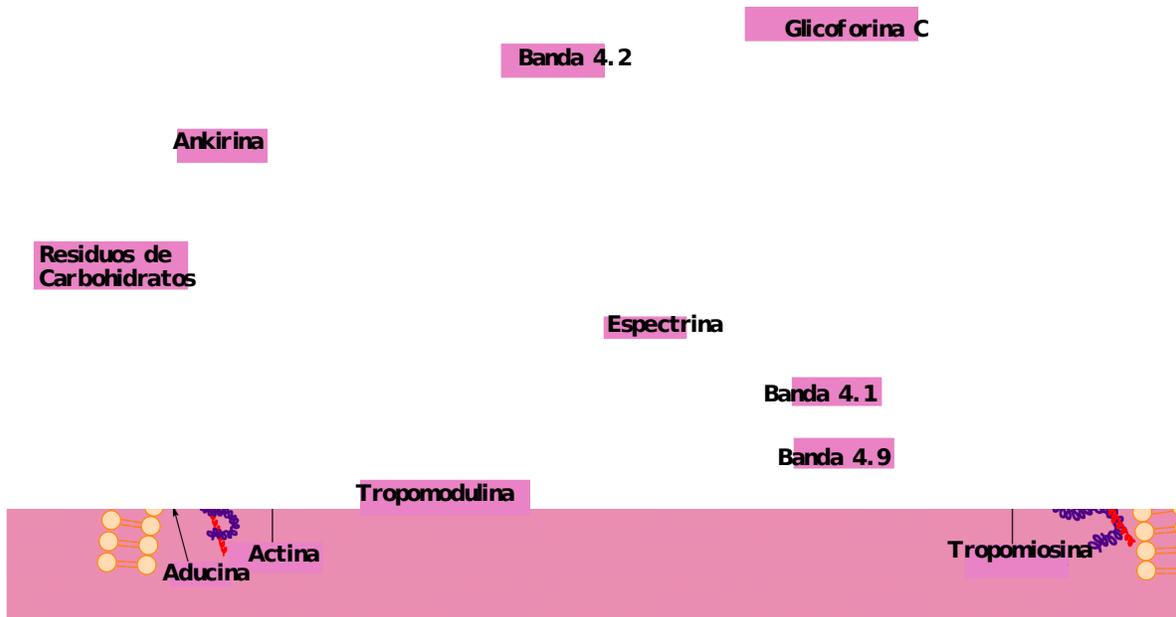


Figura 4. Membrana de eritrocito

2.8.2 Estres oxidante en la membrana del eritrocito.

La membrana plasmática puede estar sometida a una serie de cambios, ya que la rigidez de ésta se encuentra alterada en los procesos de estrés oxidante, y se ha demostrado que en los pacientes con EPOC hay una mayor rigidez en sus eritrocitos (Eaton J, Brewer G. 1974).

Se ha encontrado que existen altos niveles de catalasa, y menores niveles de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en los eritrocitos, éstas enzimas pueden metabolizar peróxido de hidrógeno y metabolitos activos del oxígeno como los radicales libres superóxido e hidroxilo (Canas, DP. et al 1988).

Por lo tanto una disminución en los niveles antioxidantes de la membrana del eritrocito podría provocar disminución de la fluidez de la membrana, alteraciones de su permeabilidad, pérdida de actividad de receptores y enzimas, afectar el transporte de oxígeno, efectos nocivos en la función secretora de membrana y disminución de la síntesis de eicoisanoides ^(Weber et al. 1986) que puede llevar a una completa pérdida de la integridad celular causando apoptosis o necrosis. Tales modificaciones pueden ser responsables de trastornos relacionados con obesidad, aterosclerosis e hipertensión arterial ^(Cazzola R. et al 2004). Es así como estos procesos han sido implicados en la patogénesis de diversas enfermedades, especialmente en aquellas patologías crónicas ^{(Vidella La. Et al 2004) (Mori Ta. et al.2004)}.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estrés oxidante en los pacientes con EPOC, pudiera ser condicionante de un deterioro mayor en la función respiratoria debido a la continuidad del daño a las estructuras de las vías respiratorias. Por lo que la evaluación del estado antioxidante de estos pacientes, podría permitir al médico considerar alternativas de manejo terapéutico que incluyan agentes antioxidantes que coadyuven a una mejor evolución del padecimiento facilitando posibles modificaciones en la terapéutica.

4. HIPOTESIS

Los productos de la lipoperoxidación en membranas de eritrocito, se incrementan conforme van evolucionando los estadios de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la participación del estrés oxidante en el daño progresivo de las membranas de los eritrocitos de pacientes con la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD I, II, III y IV) comparado con un grupo control clínicamente sano.

Como??

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Evaluar los marcadores de daño a lípidos (dienos conjugados Richard O. Recknagel et al 1984), lipohidroperóxidos (Hicks et al 1969), malondialdehído) en membranas de eritrocitos de controles sanos y de pacientes con EPOC (GOLD I, II, III Y IV) con el metodo de
- b) Evaluar la carbonilación de proteínas de controles sanos y de pacientes con

EPOC (GOLD I, II, III Y IV)

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo pertenece a un protocolo de investigación con número de registro B10-08, el cual se llevo a cabo en el laboratorio de Bioquímica Inorgánica y Medicina Ambiental en colaboración con la Clínica de Tabaquismo, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "ISMAEL COSIO VILLEGAS".

6.1 CONSIDERACIONES ETICAS

Para el desarrollo del estudio se utilizaron aproximadamente 5 ml de sangre completa obtenidas por punción venosa, la cual fue obtenida cuando los pacientes se realizaron estudios de laboratorio como parte del seguimiento de su padecimiento. Por ningún motivo se tomaron muestras de sangre, fuera de la indicación médica.

Por lo anterior este estudio es considerado por el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud como de riesgo mínimo (V.- Contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación y que se garantice el bienestar de éste).

Se informara al paciente que una parte de la sangre tomada en el laboratorio clínico se utilizará para otras evaluaciones con fines de investigación por lo que se solicitó la autorización del paciente o de algún familiar por medio de una carta de consentimiento informado (ANEXO I).

6.2 TIPO DE ESTUDIO

Tipo de investigación: Observacional Descriptivo

Método de observación: Transversal

Temporalidad: Prospectivo

6.3 CAPTACION DE PACIENTES

Los pacientes fueron captados con base a los criterios de selección, establecidos por médicos neumólogos de la Clínica de Tabaquismo del INER.

6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.4.1 Criterios de inclusión para pacientes EPOC

- Pacientes estables que cumplan con la clasificación de la GOLD.
- Pacientes de sexo indistinto, con un rango de edad de 50 a 75 años.
- Pacientes que se encuentren estables y que no tengan alguna otra enfermedad.
- Que hayan firmado el consentimiento informado.

6.4.2 Criterios de no inclusión para pacientes con EPOC

Que hayan tenido antecedentes de infección del tracto respiratorio o inestabilidad significativa del padecimiento durante un mes previo al estudio.

La presencia de cualquier otra enfermedad clínica activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis, cáncer).

6.4.3 Criterios de inclusión para el grupo Control

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

6.4.4 Criterios de no inclusión para el grupo Control

Que sean fumadores activos y/o pasivos.

Que presenten cualquier patología activa: Diabetes tipo 1 o tipo 2, infección activa (VIH, hepatitis) cáncer.

6.5 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó por medio de la fórmula de diferencia de medias.

$$N = (Z\alpha + Z\beta)^2 (2)(Sp)^2$$

$$(d)^2$$

N= Número de pacientes

$Z\alpha$ = 95% probabilidad de cometer error tipo I

$Z\beta$ = 80% probabilidad de cometer error tipo II

S_p =0.0273 nmol Dinitrofenilhidrazonas/mg proteína

D= 0.053 nmol Dinitrofenilhidrazonas/mg proteína

Se utilizó como parámetro de referencia a la varianza de los grupos carbonilo expresados como nmol de dinitrofenilhidrazonas/mg de proteína de 67 voluntarios sanos (Torres-Ramos, 2006).

$$N = \frac{(1.96+0.84)^2(2)(0.0273)^2}{(0.053)^2} = 4.1 \sim 5$$

6.6 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre completa captadas por la clínica de tabaquismo, se centrifugaron a 3000rpm, durante 15 minutos para separar el plasma del paquete de eritrocitos. Una vez obtenido el paquete de eritrocitos se lavaron dos veces con solución salina enriquecida con glucosa 1mM y en una tercera ocasión con Ringer-

Krebs pH 7.4 conteniendo 1mM de glucosa, la compactación del paquete de eritrocitos se realizó mediante centrifugación a 1000g durante 5 minutos para cada lavado. El paquete de eritrocitos es resuspendido en un volumen igual con la solución de Ringer-Krebs pH 7.4 conteniendo 1mM de glucosa.

Posteriormente se depositó 1ml de la suspensión de eritrocitos en un tubo eppendorf y se le agregó 0.8ml de la solución lítica, compuesta por buffer de fosfatos 5 mM pH 8 (S5P8), a éste buffer se le agregaron 40µL/mL de un inhibidor de proteasas y 1µL/mL de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) en el momento de usarlo.

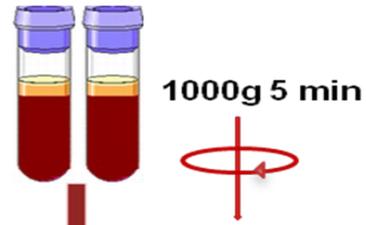
Las membranas de eritrocitos se compactaron por centrifugación de 13,000rpm durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron una serie de lavados usando la solución S5P8 hasta obtener membranas libres de hemoglobina, finalmente se resuspendieron en un volumen de 1 ml con Ringer-Krebs pH 7.4 (Medina-Navarro R. et al. 1999) Durante todo el procedimiento la solución lítica y las membranas fueron colocadas en hielo.

En la Figura 5 se presenta un resumen de la metodología.

6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL



Se lava dos veces con solución salina conteniendo glucosa 1 mM y una tercera lavada con solución Ringer pH 7.4, conteniendo 1mM de glucosa



**Carbonilación
Dienos
Lipohidroxidos
MDA
Proteínas Totales
Peso Seco**



**Membranas
(fantasmas) libres
de hemoglobina**

6.8 DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE DAÑO POR ESTRÉS OXIDATIVO

6.8.1 Biomarcadores de daño a lípidos

Los biomarcadores de daño a lípidos (dienes conjugados, lipohidróperóxidos^(Hicks JJ. et al 1996) y MDA^(Gerard- Monnier D. et al 1998)), se expresan por la materia orgánica total.

6.8.1.1 Cuantificación de Materia orgánica total

Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica total por el dicromato de potasio en una solución fuertemente ácida^(Bernal AM. ET al.198). En un tubo de vidrio con tapón de rosca, se colocaron 0.05mL de membranas de eritrocito, 0.45mL de agua y 1 mL de dicromato de potasio al 2% en ácido sulfúrico concentrado, posteriormente se depositan en baño maria en ebullición durante 20 minutos, se dejaron enfriar. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a una longitud de onda de 600 nm. Para la curva estándar se utilizó manitol (ANEXOII)

6.8.1.2 Concentración de Dienes Conjugados.

Los Dienes conjugados son el primer producto intermedio del proceso de lipoperoxidación el cual se determinó mediante el método descrito por Prior y Castle. Se adicionaron 30µL de membranas de eritrocitos a 0.17mL de agua y a 1.3mL de una mezcla de cloroformo-metanol (proporción 2:1), la solución se agitó durante dos minutos. Posteriormente se centrifugó a 4000rpm durante 10 minutos

a 20°C, para poder retirar 0.5mL de la fase orgánica, la cual se evaporó a sequedad (se calentó a 37°C en una campana de extracción) finalmente el residuo se resuspendió en ciclohexano concentrado. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a una longitud de onda de 234nm. Fue utilizado para los cálculos un coeficiente de extinción molar de dienos conjugados $\epsilon = 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados fueron expresados en nmol de dienos conjugados/mg de materia orgánica.

6.8.1.3 Cuantificación de lipohidroperóxidos

Los lipohidroperóxidos segundo producto intermedio de la lipoperoxidación, se determinaron utilizando un método iodométrico, el cual está basado en la capacidad de los peróxidos de oxidar el ión yoduro a yodo ^(Hicks JJ. Et al 1996). Se tomó una alícuota de 0.03mL de membranas de eritrocitos, se les adiciono 0.5mL del reactivo CHOL (reactivo comercial utilizado para medir esterios de colesterol, de los laboratorios Roche con el numero de lote 69206101) y 0.5 mL de yoduro de potasio 1M. Las muestras fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a una longitud de onda de 360 nm. La concentración de lipohidroperóxidos fue expresada en nmol de LHP/mg materia orgánica. Se utilizó como estándar el terbutil hidroperóxido. (ANEXO III)

6.8.1.4 Cuantificación de MDA por la reacción con MPI (1-methyl-2-phenylindole)

Este método se basa en la reacción del N-metil-2-fenil-indol (MPI) con el Malondialdehído (MDA) para formar un aducto denominado carbocianina (FIGURA 6) el cual produce una intensa coloración con una absorción máxima a una longitud de onda de 586 nm. (Gerard- Monnier D. et al 1998)

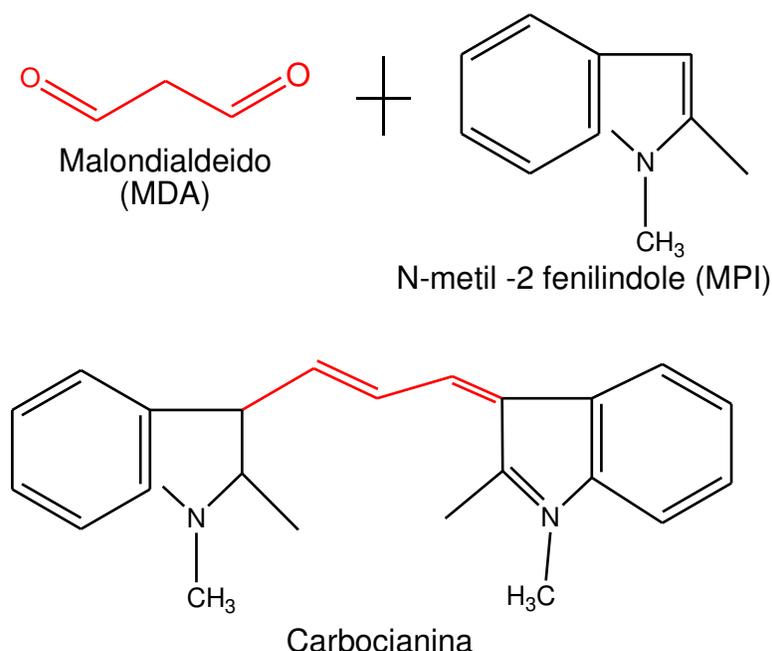


FIGURA 6 Formación de carbocianina

Para cuantificar el MDA, A 0.03mL de membranas de eritrocitos, se les adiciono 0.65mL de MPI 15 mM, 0.15mL de HCl concentrado. Las muestras fueron incubadas a 45°C durante 40 minutos. Finalmente las muestras son centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a una longitud de onda de 584 nm. La concentración de MDA se expreso en nmol de MDA/mg

materia orgánica. Para la curva de calibración fue utilizado el Tetraetoxipropano (TEP) como estándar (ANEXO IV).

6.8.2 Biomarcador de daño a proteínas

6.8.2.1 Cuantificación de la carbonilación de proteínas

Uno de los biomarcadores más utilizados de daño a proteína es la cuantificación de grupos carbonilos (Dalle-donne et al, 2003). Cuando existe un daño a proteína, los grupos carbonilos expuestos reaccionan con dinitrofenilhidrazina, el grupo carbonilo se une al amino formando así dinitrofenilhidrazona, la cual se lee en el espectrofotómetro a 370 nm. (Figura 6)

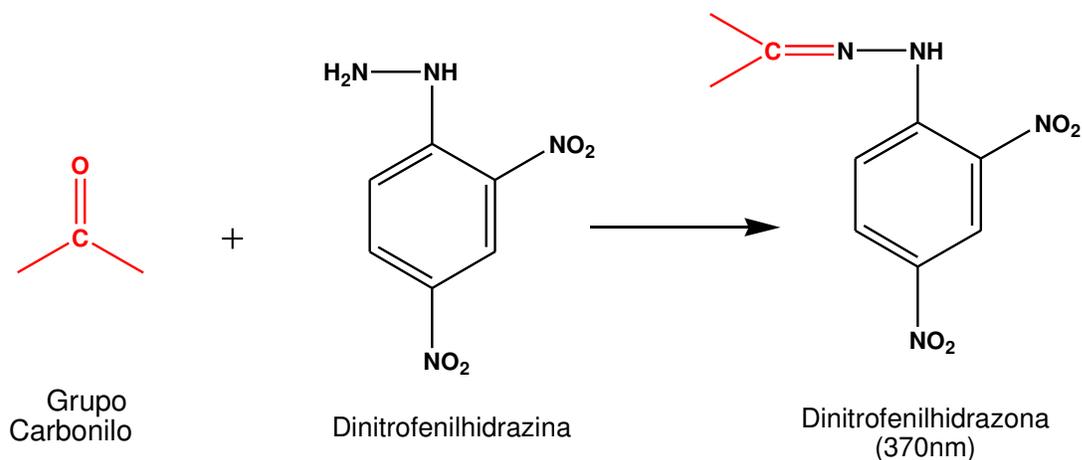


FIGURA 7. Formación de Dinitrofenilhidrazonas

Se mezclaron 50µl de fantasmas con 500µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM en HCL 2.5 M.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente evitando la incidencia de la luz (fueron agitadas cada 15 minutos durante 60 minutos) y precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Se centrifugaron por 5 minutos a 3000 rpm para recolectar la proteína precipitada. La pastilla se lavó nuevamente con 500µl de TCA al 10%. Finalmente el precipitado se disolvió en 500µl de guanidina 6M en fosfato de potasio 20 mM, e incubados por 10 minutos a 37°C. Finalmente se analizó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 370 nm (Dalle-Donne, 2003).

El coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina es de $\epsilon = 22,000/M^{-1} \text{ cm}^1$, el cual fue utilizado para calcular la concentración de carbonilos, expresados en nmol de dinitrofenilhidrazinas/mg de proteína. (ANEXO VI)

El biomarcador de daño a proteínas (carbonilación de proteínas) se expresó por mg de proteína cuantificados por el método de Lowry (Lowry OH, et al. 1950).

6.8.2.2 Cuantificación de proteína

Se tomaron 0.01 mL de membranas de eritrocito, y se les adicionaron 0.24 mL de agua, 1ml de una Solución cupro-alkalina (Na_2CO_3 al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en NaOH 0.1N.) y una Solución de CuSO_4 al 0.5%. Las muestras fueron mezcladas e incubadas 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 0.1mL de la solución de Reactivo de Folin-Ciocalteu, las muestras fueron agitadas e incubadas 45 minutos a temperatura ambiente. La

absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VID modelo B050-9914 a una longitud de onda de 550nm. Para la curva de calibración fue utilizada albúmina bovina como estándar ^(Lowry OH, et al. 1950). (ANEXO V)

6.9 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se analizaron mediante diferentes pruebas estadísticas, prueba de t de student para muestras independientes, ANOVA de una vía, comparaciones múltiples mediante una prueba post-hoc de Bonferroni, correlación de Spearman y regresión lineal. Mediante el programa Prisma 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Los datos fueron expresados como la MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR se considero una significancia del 95% y una potencia del 80%.

7. RESULTADOS

7.1 DATOS DEMOGRAFICOS DEL GRUPO CONTROL Y DE PACIENTES CON EPOC GOLD I, II, III y IV.

En la tabla 2 se observan los datos de peso talla e índice de masa corporal, los cuales mediante una ANOVA de una vía no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de pacientes y en el grupo control.

Tabla 2. Datos demográficos de los grupos de estudio.

PARAMETROS	CONTROL		GOLD I		GOLD II		GOLD III		GOLD IV	
N	10		6		13		10		4	
GENERO	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
	10	0	1	5	5	8	4	6	0	4
EDAD	63.12±8.45		72±8.90		66.2 ±13.94		70.3± 7.22		69.5±6.45	
IMC	29.5 ±4.0		30.87 ±5.1		28.31± 6.2		24.85 ±4.0		24.86±5.6	

7.2 DAÑO A LIPIDOS

7.2.1 Determinación de dienos conjugados en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

La Figura 7 muestra la concentración de dienos. En el eje de las abscisas están representados los diferentes estadios de la EPOC. En el eje de las ordenadas se encuentran las concentraciones de dienos conjugados expresados en nmol/mg materia orgánica. En los grupos de EPOC III dienos ($p<0.01$) y IV

($p < 0.001$) se observa un aumento estadísticamente significativo en la concentración de dienos conjugados, en comparación con el grupo control.

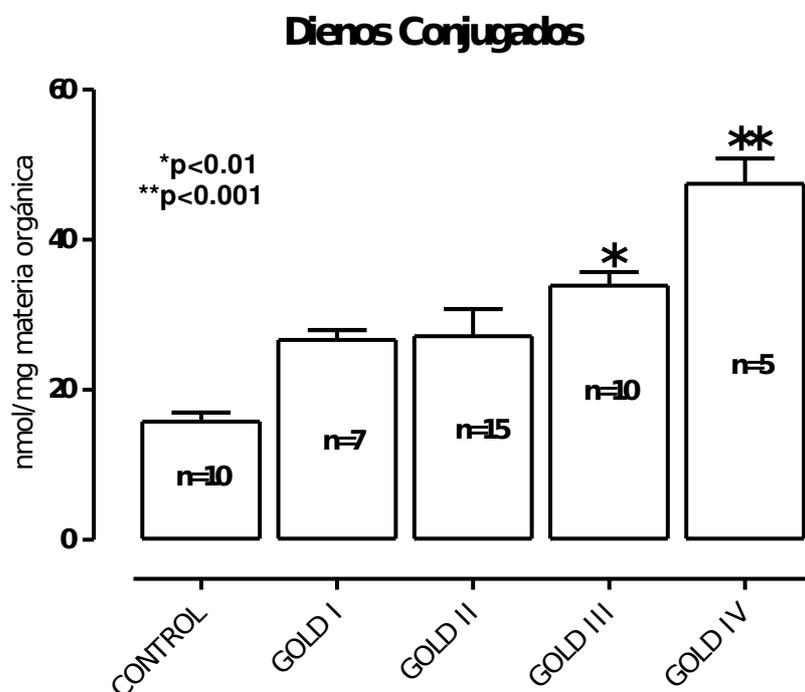


Figura. 7 Concentración de dienos conjugados durante el proceso de lipoperoxidación en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

7.2.2 Determinación de Lipohidroperóxidos en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

La Figura 8 muestra la concentración de lipohidroperóxidos. En el eje de las abscisas están representados los diferentes estadios de la EPOC. En el eje de las ordenadas se encuentran las concentraciones de lipohidroperóxidos expresados en nmol/mg materia orgánica. En el el estadio III y IV se observa

un aumento estadísticamente significativo en la concentración de lipohidroperóxidos en ambos casos con una $p < 0.01$, en comparación con el grupo control.

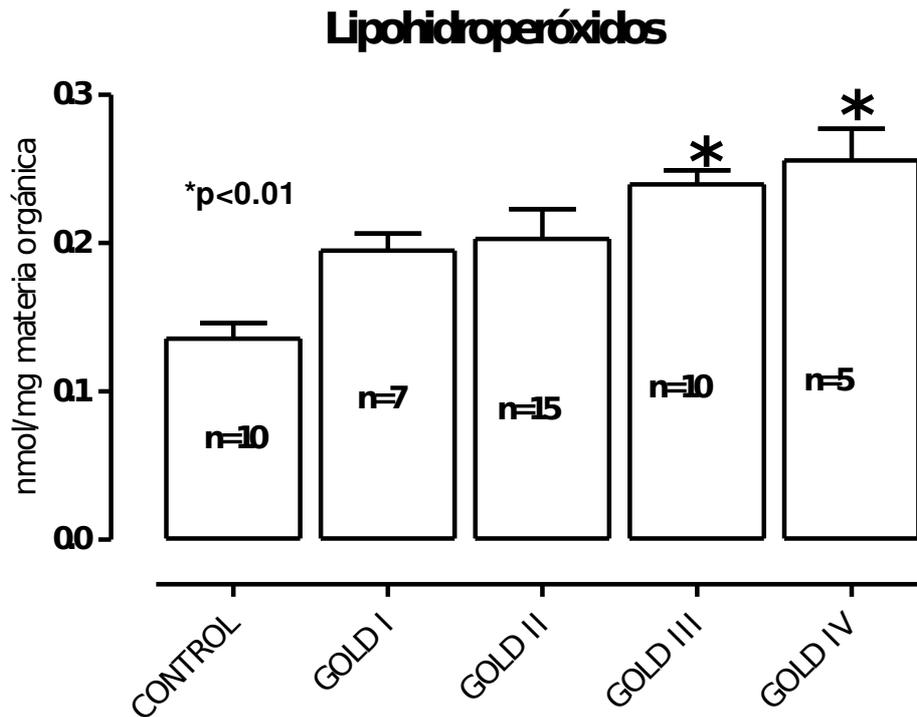


Figura 8. Concentración de Lipohidroperóxidos en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

7.2.3 Determinación de Malondialdehído en grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

La Figura 9 muestra la concentración de malondialdehído (MDA). En el eje de las abscisas están representados los diferentes estadios de la EPOC. En el eje de las ordenadas se encuentran las concentraciones de MDA expresados en nmol/mg materia orgánica. Se aprecia un aumento en GOLD I comparado con

el grupo control y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los demás grupos.

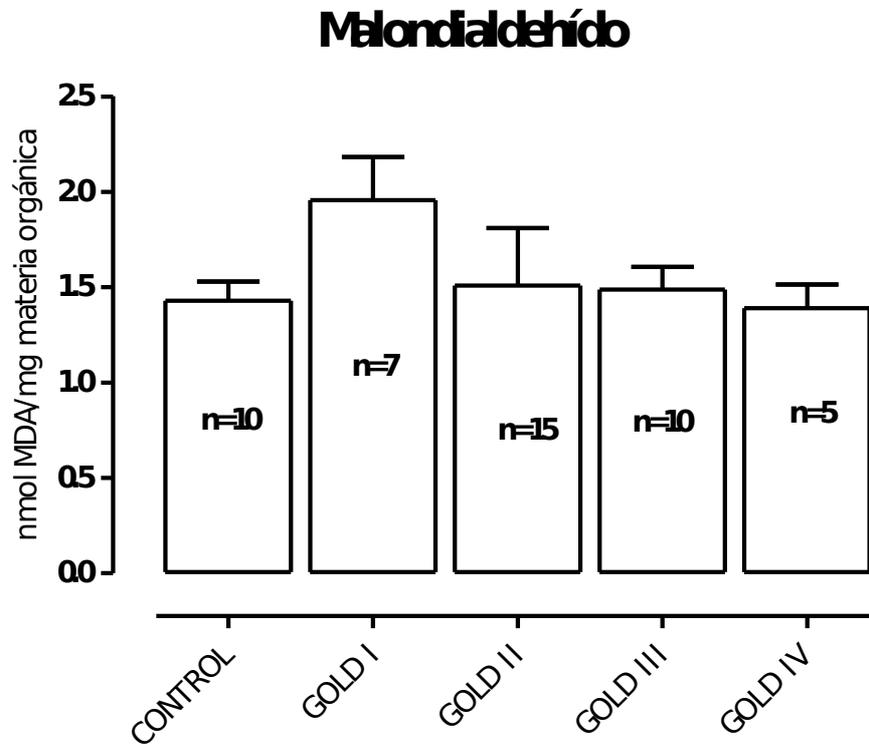


Figura. 9 Concentración de malondialdehído en el grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

7.3 DAÑO A PROTEINAS

7.3.1 Determinación de grupos carbonilo

La Figura 10 muestra la concentración de los grupos carbonilos expuestos. En el eje de las abscisas están representados los diferentes estadios de la EPOC. En el eje de las ordenadas se encuentran las concentraciones de grupos carbonilos expuestos expresados en nmol DNPH/mg proteína. En el GOLD IV

($p < 0.05$) se observa un aumento estadísticamente significativo en la concentración de carbonilos expuestos, en comparación con el grupo control

Carbonilación de Proteínas

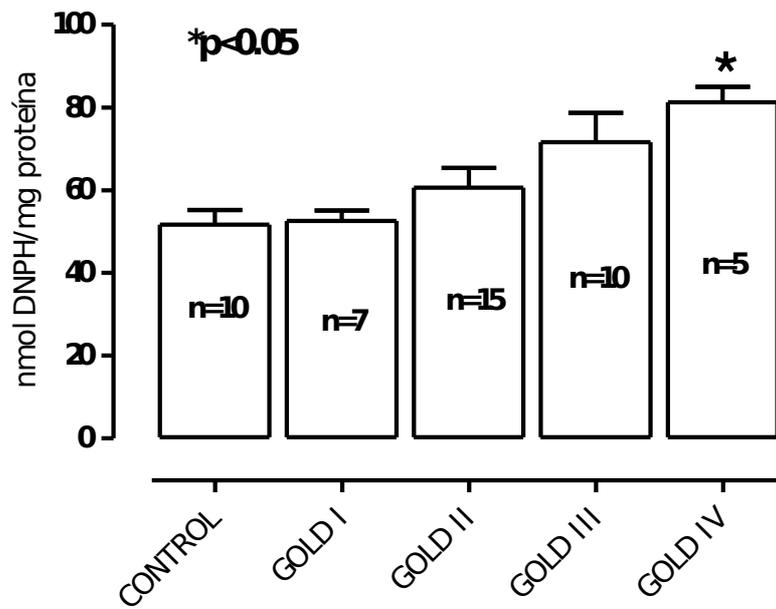


Fig. 10 Determinación de grupos carbonilo en el grupo control y en EPOC (I, II, III y IV).

7. DISCUSION

El elemento imprescindible para la vida de los seres aeróbicos es el oxígeno; elemento que es metabolizado hasta formar agua como producto final de la cadena respiratoria, en un proceso acoplado a la generación y atrapamiento de energía en forma de enlaces químicos. Se calcula que durante este proceso del 100% de oxígeno respirado en la mitocondria en los organismos eucariontes, en condiciones fisiológicas, del 1 al 3%, no culmina su reducción completa dando lugar a la formación de radicales libres (RL) como es el caso del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Sastre, 2000). Estas reacciones son inevitables en un organismo dependiente de oxígeno como el ser humano. Por otro lado es importante considerar que los radicales libres formados por procesos diversos son necesarios para la realización de varios procesos fisiológicos, incluyendo la fertilización del óvulo por el espermatozoide (Hicks & Pedron, 1975) y la activación de genes (Lai & Wong, 2005). Los radicales libres también participan en los mecanismos de defensa del organismo durante una infección, realizando lisis bacteriana (Halliwell, 1994). En contraste los radicales libres formados también pueden causar modificaciones en diversas biomoléculas, alterando su función. Estos cambios moleculares pueden ser evidenciados por metodologías ya bien establecidas, con las que se demuestra el daño por especies reactivas de oxígeno (ERO) a lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Halliwell, et al, 2004). Este daño molecular en condiciones fisiológicas (personas sanas) es mínimo ya que la actividad de los RL está regulada por los sistemas

antioxidantes. La concentración y la actividad de estos sistemas antioxidantes son dependientes de múltiples factores, entre ellos: la alimentación, el sedentarismo, el sobre peso, el tabaquismo y el proceso de envejecimiento ^(McCord, 2000) entre otros,

Sin embargo cuando por alguna patología, los sistemas productores de ERO sobrepasan la capacidad neutralizante de los sistemas antioxidantes del organismo, se establece el desequilibrio metabólico denominado como estrés oxidante ^(Beal, 1990). Estado metabólico asociado al proceso inflamatorio en la EPOC.

La EPOC en la actualidad es un problema de salud pública y dada su creciente progresión se considera que será la quinta causa de discapacidad y la tercera de mortalidad en el mundo para el año 2020. ^(Lopez, 1998). Por lo que consideramos de vital importancia estudiar a las membranas de eritrocitos de pacientes con EPOC, ya que estos son los responsables en el transporte del oxígeno a los tejidos, por lo que un mal funcionamiento nos puede llevar a una mala oxigenación propiciando la hipoxia tisular, característica importante en los pacientes con esta enfermedad.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son los responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula (Muriel 1997). Los PUFA son las moléculas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación nos lleva a la lipoperoxidación. Por lo descrito anteriormente es de vital importancia valorar la

integridad de la membrana de eritrocitos ya que estos carecen de núcleo y pierden sus mitocondrias en la medida en que maduran, los eritrocitos maduros no poseen una maquinaria celular que les permita obtener energía, sintetizar proteínas y ácidos nucleicos como el resto de las células del organismo por lo que el eritrocito utiliza vías alternas para cumplir con sus funciones vitales, así como el mantener la integridad de su membrana. (Joppa P, et al 2007)

En este trabajo se cuantificaron los biomarcadores primarios (dienos conjugados), intermedios (lipohidroperóxidos) y finales (MDA) del proceso de lipoperoxidación, así como también se cuantificó el daño a proteína midiendo la carbonilación de proteínas en los diferentes estadios de la EPOC (GOLD I, II, III y IV), comparándolos con un grupo control.

En la actualidad existen diferentes grupos de trabajo los cuales han demostrado que los eritrocitos de pacientes con EPOC presentan modificaciones morfológicas y funcionales: con una disminución en la expresión de proteínas de membrana (glicoforina) (De Castro J. et al 2007). Estas alteraciones pueden explicar la modificación de la plasticidad del eritrocito que es esencial para su funcionamiento y forma. (Straface E, et al 2000). Sin embargo no demuestran si estas modificaciones están relacionadas con la progresión de la enfermedad. Como se demuestra en la figura 7 donde se puede apreciar un aumento en la concentración de dienos conjugados en los pacientes con EPOC, el GOLD III presenta un incremento del doble, mientras que el GOLD IV presenta un incremento de tres veces mayor, con respecto al control.

El mismo comportamiento se observa en la figura 8, en el que se presenta un aumento de los lipohidroperóxidos con respecto a la progresión de la enfermedad, observándose un aumento dos veces mayor con respecto al grupo control.

Las concentraciones de MDA no muestran una diferencia significativa entre los pacientes con EPOC y el grupo control (Figura 9). Aparentemente se aprecia, que hay una tendencia en la disminución de MDA en los diferentes estadios de la EPOC.

El daño a lípidos es un evento llevado a cabo en procesos agudos, que pueden ser regulados con el aumento de la capacidad antioxidante total de plasma del paciente con una dieta rica en antioxidantes o suplemento que los contengan o también evitando la fuente de ERO, como pudiera ser el uso de antioxidantes.

EL echo de que el MDA se presente una disminución puede ser explicado a debido a que el MDA, por ser un producto muy reactivo puede reaccionar con el grupo amino terminal de un péptido formando una base de Schiff, la estructura de este compuesto se reordena hacia una forma más estable, denominada producto de Amadori, dejando expuesto un grupo carbonilo, el cual puede ser detectado por la reacción de dinitrofenilhidrazina para formar dinitrofenilhidrazonas^(Gerard- Monnier D. et al 1998). Por lo tanto la ausencia aparente de MDA en las membranas de eritrocito de los pacientes con EPOC puede ser explicada por el incremento en la formación de aductos proteicos y reflejada en la carbonilación de proteínas (figura 10), en donde hay un aumento de este en comparación a la progresión de la EPOC. Debido a

que las proteínas son muy sensibles al ataque de los productos finales del proceso de lipoperoxidación. La exposición de los grupos carbonilos pueden originarse por, a) el ataque directo por las especies reactivas de Oxígeno y/o nitrógeno, b) la interacción con metales de transición, c) la glicación, o d) por formación de aductos entre las proteínas y algunos productos de la lipoperoxidación. La EPOC es un proceso crónico degenerativo, condición que se corrobora al encontrar que las proteínas están alteradas, visto esto como un aumento en la exposición de grupos carbonilo (Figura 10) conforme a la evolución de la a EPOC.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se aprecia que existe un daño molecular ocasionado por el estrés oxidativo a lípidos (dienos conjugados, lipohidroperóxidos y malondialdehído) y a proteínas (exposición de grupos carbonilo).

Por lo tanto se demuestra que el estrés oxidativo puede ser considerado como un factor importante en la progresión de la EPOC. Ya que además contribuye a amplificar el proceso inflamatorio y puede ser responsable de la resistencia a los efectos antiinflamatorios de los corticoides, por lo que la mejora del conocimiento de los mecanismos que subyacen al desarrollo de la EPOC puede proporcionar ayuda relevante en el desarrollo de nuevos tratamientos y abre un mundo de posibilidades para mejorar el cuidado y el pronóstico de esta enfermedad como lo es el uso de antioxidantes como coadyuvantes en la terapéutica, lo que nos

conduciría a mejorar la capacidad antioxidante del paciente, por lo que es posible retardar las complicaciones, y la evolución de dicha enfermedad.

8. CONCLUSIONES

Como efecto del estrés oxidante presente en la EPOC se determinaron las siguientes alteraciones en las membranas de eritrocito:

- Se presenta daño oxidante a lípidos el cual se ve reflejado en el aumento en las concentraciones de dienos conjugados y lipohidroperóxidos en membranas del eritrocito, conforme a la progresión de la EPOC.
- EL MDA no resulto ser un buen marcador para corroborar la progresión de la enfermedad con el estrés oxidante presente en las membranas de eritrocito.
- Se presenta daño oxidante en proteínas, se ve reflejado por un aumento en la carbonilación de éstas en membranas de eritrocito, conforme a la relación con la progresión de la EPOC.
- Se identificó la participación del estrés oxidante en las membranas de eritrocitos de pacientes con EPOC. El grado o la importancia de su implicación como causa o

consecuencia del proceso que caracteriza esta enfermedad ésta aún por aclararse definitivamente.

10. PERSPECTIVAS

Se requiere actualmente más investigación, para responder algunas de las preguntas clave. Sin embargo, la disponibilidad de tejidos de pacientes con EPOC y de pacientes sin EPOC y el desarrollo de nuevas técnicas celulares y moleculares, hace pensar en rápidos progresos. Podría ser posible predecir cuáles pacientes desarrollarán EPOC e identificar objetivos para nuevas terapéuticas que supriman este proceso inflamatorio crónico. Muchas nuevas drogas para la obstrucción pulmonar crónica se encuentran ya en etapa de desarrollo, y varias de ellas serán probadas en estudios clínicos.

Por lo tanto se considera relevante ampliar lo descrito, aumentando los marcadores de estrés oxidante, además de analizar los sistemas antioxidantes y tratar de apoyar estas investigaciones con la administración de antioxidantes en la dieta de los pacientes como una posible opción terapéutica.

11. BIBLIOGRAFÍA

Albert VV, Jason PE, Barry H, Carroll EC. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem* 272(12): 7617-7625, 1997.

Amici A, Levine RL, Stadtman ER. Conversion of amino acids residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. *J Biol Chem*. 264:3341-3346, 1989.

Aviram M, Rosenblat M, Charles LB, Roger SN, Sergio L, Bert N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves. *J Clin Invest* 101(8):1581-1590, 1998.

Babior B. M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109:33-44, 2000.

Babior B.M, Lambeth, J.D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-344, 2002.

Barnes PJ, Karin M.. Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 336:1066-1071, 1997.

Bathoorn Erik, Jeroen JW Liesker, Dirkje S Postma, Gerard H Koëter, Marco van der Toorn, Sicco van der Heide, H Alec Ross, Antoon JM van Oosterhout, and Huib AM Kerstjens. Change in inflammation in out-patient COPD patients from stable phase to a subsequent exacerbation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2009; 4: 101–109.

Beal FM. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Mech Ag Dev*. 53:217-227, 1990.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferenick M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65(18-19):1865-1874, 1999.

Bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* 34(7):824-829, 2003.

Brigelius-Flohe, R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27, 951-965.

Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 5(9):2274-2279, 1991.

Cano VF, Ibarra PC, Morales GJ. Enfermedades respiratorias, temas selectos. ELSEVIER España, 141- 152, 241-251, 2006.

Cazzola R, Rondanelli M, Russo-volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res.* 2004; 45:1846-51.

Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N., and Hoshi, T. (1997).
Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9932-9937.

Czapski, G. (1984). Reaction of .OH. *Methods Enzymol* 105, 209-215.

Dalle-Done I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329(1-2):23-38, 2003.

De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, Sardina JL, Llanillo M, Sánchez-Yagüe JRadiology Service, Santísima Trinidad Foundation Hospital, Salamanca, Spain. 2007 Feb;18(1):43-51

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002).
A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111, 471-481.

Fauman EB, Saper MA: Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *TIBS* 1996; 21: 413-417.

Farr, S. B., D'Ari, R., and Touati, D. (1986). Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8268-8272.

Ferreti G, Bachhheti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins an their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 138(4):163-169, 2001.

Feldman C, Anderson R, Kanthakumar K, Vargas A, Cole PJ, Wilson R. Oxidant-mediated ciliary dysfunction in human respiratory epithelium. *Free Radic Biol Med.* 1994;17:1-10.

Flint, D. H., Tuminello, J. F., and Emptage, M. H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369-22376.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Armes B. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hidroxy-2-nonenal: formation of cross-linked protein which inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269(34):21639-21643, 1990.

Fridovich, I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci* 7, 2688-2690.

Garner, B., Witting, P. K., Waldeck, A. R., Christison, J. K., Raftery, M., and

Stocker, R. (1998). Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol.

J Biol Chem 273, 6080-6087.

Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiology conditions. *Nature* 391:169-173, 1998.

Guyton-Hall. Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, sistema monocito-macrófago e inflamación. En *Tratado de Fisiología Médica*, décima edición. *Ed. McGraw-Hill*, pp 477-487. 2001

Halliwell B & Whiteman Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Brit J Pharma.*; 142:231-255, 2004

Halliwell B, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*; 344:721-724, 1994

Hicks JJ, Medina-Navarro R, Guzman-Grenfell A, Wachter N, Lifshitz A. Possible effect of air pollutants (Mexico City) on superoxide dismutase activity and serum lipoperoxides in the human adult. *Arch Med Res. Summer*;27(2):145-149, 1996.

Hicks JJ, Pedron N. Structural and metabolic changes of the fertile spermatozoid. I. Maturation and capacitation. *Ginecol Obstet Mex. Jan.* 37(219):35-48, 1975.

Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 185:260-263, 1992.

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Resp Cell Mol Biol* 4(3):278-286, 1991.

Hoffmeyer FR, Harth V, Merget N, Goldscheid D, Heinze E, Egens P, Pesch B, Bungert J, Bruning M, Raulf-Heimsoth. Exhaled Breath Condensate Analysis: Evaluation of a methodological setting for epidemiological. *Journal of physiology and pharmacology* 2009, 58, suppl 5, 289-298.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57, 395-418.

Janssen YM, Van HB, Borm PJA, Mossman Bt . Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69(3):261-274, 1993.

Joppa P, Petrášová D, Stancák B, Dorková Z, Tkáčová R. Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension. Department of Respiratory Medicine and Tuberculosis, Faculty of Medicine, P.J. Safárik University and L. Pasteur Teaching Hospital, Rastislavova 43, 041 90 Kosice, Slovakia.2007;119(13-14):428-34

Keyse S.M: Protein phosphatases and the regulation of mitogen activated protein kinase signalin. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 186-192.

Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262, 660-666.

Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L y cols.. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest.* 106:1311-1319, 2000.

Keyse S.M: Protein phosphatases and the regulation of mitogen activated protein kinase signalin. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**: 186-192.

Kharitonov SA, Barnes PJ.. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:1693-1772, 2001.

Koopenol WH. The Haber Weiss cycle 70 years later. *Redox Report* 6(4):229-234, 2001.

Krinski BS, Yu BP. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2):248-254, 1992.

Kirkman, H. N., Galiano, S., and Gaetani, G. F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262, 660-666.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15036-15040.

Li XY, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax.* 1996;51:465-71.

Lowry OH, roserbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1950

Luczaj W and Shrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mor Biol Lett* 8(2):391-413, 2003.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Conelly PW, Hegele RA. Paraonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76, 1996.

Macnee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 429:195-207, 2001.

Maddipati KR, Marnett LJ, Characterization of de major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem* 262(36):17398-17403, 1987.

Marklund SL, Holme E, Hellener L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta* 126(1):41-51, 1982.

Marrieta L. Harrison, Prema Rathinavelu, Paolo Arese, Robert L. Geahlen, Philip S. Low. Role of Banda 3 Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of Erythrocyte Glycolysis. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 1991; 266 (7): 4106-4111.

Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol* 8, 162-168.

McCord JM. Evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108:652-659, 2000.

Miravittles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R. Costs of chronic bronchitis and COPD: a 1-year follow-up study. *Chest.* 123(3): 789-791. 2003.

Morgan MC, Rashid RM. The effect of phototherapy on neutrophils. *Int Immunopharmacol.* 2009 Apr;9(4):383-8. Review.

Mori Ta, Beilin LJ, Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6:461-7.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 79(2):279-288, 1989.

Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P.. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med.* 93: 389-396, 1999.

Olivares Corichi I.M., Guzmán Grenfell A.M., Medina Navarro R. y Hicks, JJ. Especies reactivas del oxígeno (ERO): Bioquímica inorgánica y biomedicina. En JJ Hicks. *Bioquímica* 2da Ed. McGraw-Hill pp-690-708, 2006

Olivares Corichi IM, Santillan-Medina R, Valle-Laisequilla, Pindaro A, Hicks, JJ. Increase of human plasma antioxidant capacity with a novel formulation of antioxidants. *Proc West Pharmacol Soc.* 46:45-57, 2003.

Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Granados-Silvestre MA, Maldonado PD, Olivares-Corichi IM. Post-transcriptional control of catalase expression in garlic-treated rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 216(12):9-19, 2001.

Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 156: 341-357, 1997.

Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. *J Biol Chem* 267:6142-6146, 1992.

Sastre J, Pallardo FV, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*.49:427-435. 2000

Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin*

Wochenschr 69, 965-968

Sies, H. (1993). Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection.

Mutat Res 299, 183-191.

Sies, H., and Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat*

Res 275, 367-375.

Sigalov, A. B., and Stern, L. J. (1998). Enzymatic repair of oxidative damage to

human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* 433, 196-200.

Schols AM, Wouters EF. Nutritional abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2000 Dec;21(4):753-62. Review.

Stadtman, E. R., and Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of

free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25,

207-218.

Sun H, Tonks NK: The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *TIBS* JC. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatase SHP-1 and SHP-2: regulators of B cell signal transduction. *Curr Opin In Immunol* 2000; **12**:307-315.

Tonks NK, Neel BG: Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**:182-195.

Thomas JP, Maiorini M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipids and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem*. 265:454-461, 1990.

Torres Ramos, Y.D, Sierra Vargas, MP., Olivares-Corichi, IM., Hicks, JJ.. Marcadores plasmáticos de estrés oxidante en población mexicana sana de 30-60 años de edad.. *Rev Inst. Nal. Enf. Resp.* (en prensa), 2006.

Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J. Oxidative Stress And depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2004; **37**:1499-507.

Weber, P.C., Fisher, S., Von Schacky, C., Lorenz, R.Y Strasser, T. Dietary Omega-3 polyunsaturated fatty Acid and Eicosanoid formation in man. En: Simopolous, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. Health effects of polyunsaturated fatty acids in sea foods. The United States of the American. Academy Press. Inc. 1986. pág. 49-60.

William MacNee MD. Oxidants/antioxidants and COPD. *CHEST* 117:303S-317S, 2000.

Yagi K. Sample procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free radical and Antioxidant Protocols* 108:101-106, 1998.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74(1):139-162, 1994.

Zapata PD, B. Colas, P. López-Ruiz, R.M. Ropero, R.M. Martin, F.J. Rodríguez, F.J. Gonzalez, J.I. López, J.C. Angulo. Fosfotirosina fosfatasa SHP-1,

somatostanina y cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas* 2004; **28** (4): 269-285.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE PESO SECO

Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica por el dicromato de potasio en una solución fuertemente ácida.

Reactivos:

Solución estándar de manitol: 0.02g en 10mL de agua destilada.

Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2% en $[H_2SO_4]$

Curva estándar:

TUBO	MANITOL		H ₂ O (μ L)	K ₂ Cr ₂ O ₇ (mL)
	μ L	mg		
B	-----		500	1000
1	50	0.1	450	1000
2	100	0.2	400	1000
3	150	0.3	350	1000
4	200	0.4	300	1000
5	250	0.5	250	1000

Los tubos se colocaran en hielo para agregarles el dicromato de potasio, se agitan con cuidado manteniéndolos en el hielo para evitar que se sobrecaliente la mezcla.

Posteriormente los tubos se colocan en baño maria durante 20'.

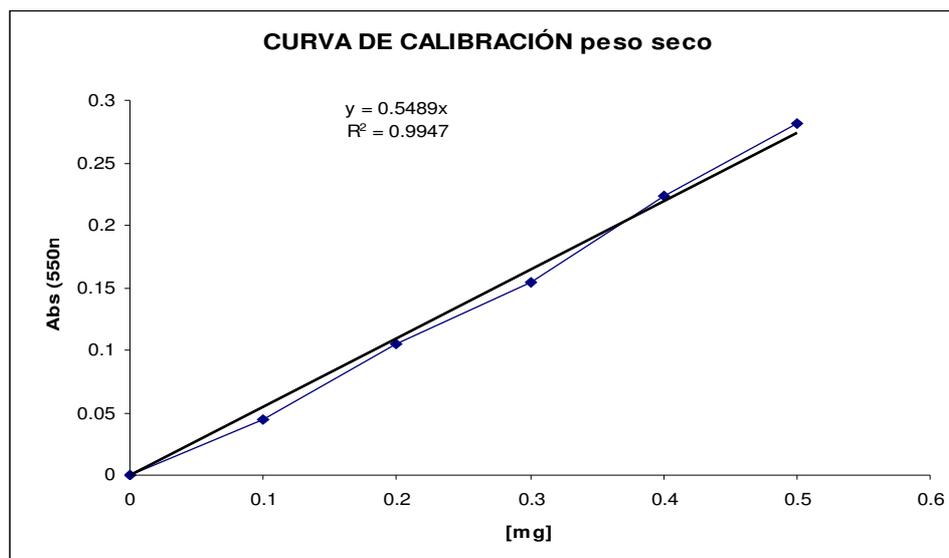
Se enfrían los tubos y se lee a 660 nm.

FANTASMAS

Se toman 50 μL de membranas de eritrocito, 450 μL de agua y se le agrega el mL de dicromato, se sigue el procedimiento señalado anteriormente.

Para realizar los cálculos es utilizado el factor obtenido de la curva de calibración que es de **1.8**

[mg]	Abs
0	0
0.1	0.045
0.2	0.105
0.3	0.154
0.4	0.223
0.5	0.282



ANEXO II

CURVA ESTÁNDAR DE LIPOHIDROPEROXIDOS CON TERBUTILHIDROPEROXIDO

Ter-butilhidroperoxido

PM= 90.12 g/mol

Densidad= 0.808g/cm³

[10mM]

5µL en un V_F de 1000 µL = [0.025mM]

10µL [0.05mM]

15µL [0.075mM]

20µL [0.1mM]

25µL [0.125mM]

90.12 — 1000mM

1.8024 — 10mM — 1000mL

0.00225g — 5mL

D= m/v

d=0.808g/cm³

v= 0.00225g/0.808g/cm³= 2.8 µL

Tomar 2.8 µL de la [solución] aforar a 5mL

KI [1M]

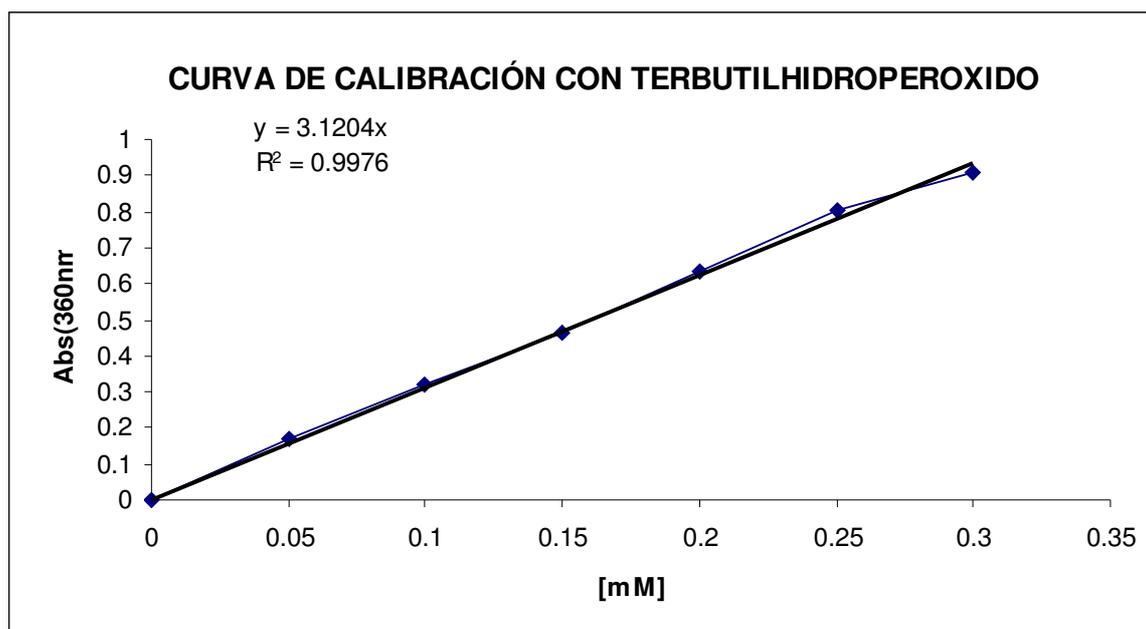
300 µL en un V_F de 1000 µL = [0.3M]

PM= 166.01

166.01 — 1.0M — 1000mL

4.150g — 25mL

8.300g — 50mL



ANEXO III

TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE MDA POR EL MÉTODO DE 1-METHYL-2-PHENYLINDOLE

SOLUCIONES:

Tetraetoxipropano (TEP) [50 nmoles/mL]

PM = 220.3, >95%

D= 0.92 g/mL

4.1M (4.1 μ moles/ μ L)

**Tomar 61 μ L (250 μ moles) y disolver en 50 μ L de H₂O = solución 1 = [5 μ L/
mL]**

Agitar vigorosamente

Realizar una dilución 1:100 de la sol. 1

0.5 mL : 50mL H₂O = [50 nmol/mL]

1-Methyl-2-phenylindole (MPI) [15mM]

PM = 207.3

207.3g — 1000mM

3.109 — 15Mm — 1000mL

0.06218 g — 20 mL en acetonitrilo-metanol

Acetonitrilo-Metanol 3:1

45 mL de acetonitrilo + 15 mL de metanol

Tubo	TEP [50 nmol/mL]	H ₂ O	MPI [15Mm]	HCl 37%
0	-----	200	650	150
1	10	190	650	150
2	20	180	650	150
3	50	150	650	150
4	100	100	650	150
5	200	-----	650	150
	μL	μL	μL	μL

Tapar con papel parafilm y agitar

Incubar 40' a 45° C

Dejar enfriar 5 min (muy importante para desarrollar color)

Agitar

Leer a 584 nm

 $\epsilon_{586 \text{ nm}} = 110 \text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Tubo	Buffer de fosfatos [50mM] pH 7.4	Plasma/G host	MPI [15Mm]	HCl 37%
B	200	-----	650	150
GHOST	170	30	650	150

Mismo procedimiento hasta agitar.
 Centrifugar 10,000 rpm durante 5 minutos.
 Leer a 584 nm.

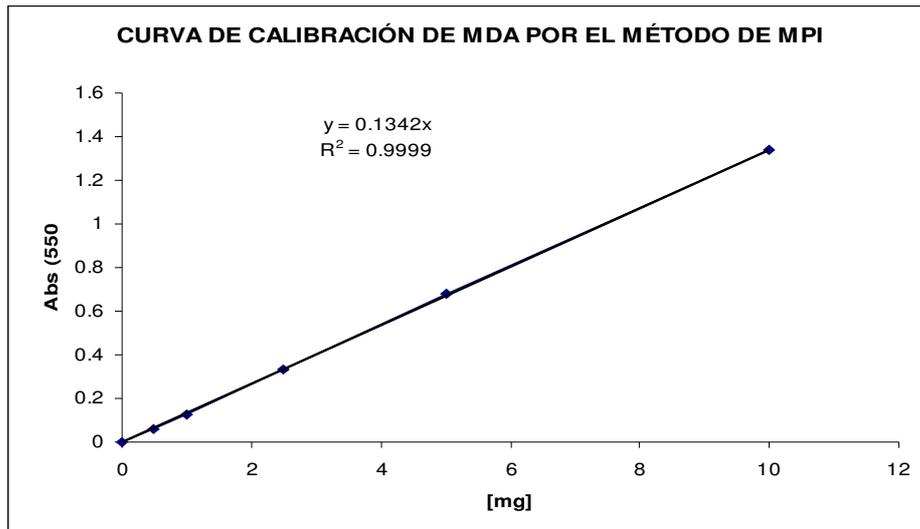
[nmoles]	Abs
0	0
0.5	0.0599
1	0.1251
2.5	0.3346
5	0.677
10	1.3401

FACTOR
7.4900461

19

2.5367

2



ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Reactivos:

A) Solución de Na_2CO_3 al 2% y tartrato de sodio y potasio al 0.02% en NaOH 0.1N.

Na_2CO_3

2g — 100mL

10g — 500mL

Tartrato de sodio y potasio

0.02g — 100mL

0.10g — 500mL

NaOH

40g — 1N

4.0g — 0.1N — 1000mL

2.0g — 500mL

B) Solución de CuSO_4 al 0.5% en agua destilada.

0.5g — 100mL

1.25g — 250mL

C) Solución cupro-alcalina, 50 ml de la solución A con 1ml de la solución B. *Se prepara al momento de usarse.*

D) Reactivo de Folin-Ciocalteu. Diluido en una proporción 1:1 en agua destilada.

E) Solución estándar. Albúmina bovina 0.3 mg en 1 ml de agua destilada.

TUBO	ASB (μ l) - []	H ₂ O (μ l)	SOL. C (mL)	SOL. D (μ l)
0	---- ----	250	1.0	100
1	50----0.01 5	200	1.0	100
2	100— 0.03	150	1.0	100
3	150— 0.045	100	1.0	100
4	200— 0.06	50	1.0	100
5	250— 0.075	----	1.0	100

*

**

* Mezclar e incubar 10 minutos a T.A.

** Mezclar e incubar 45 minutos a T.A.

Leer a 550nm

TUBO	FANTASM AS (μ l)	H ₂ O (μ l)	SOL. C (mL)	SOL. D (μ l)
CALIBRAR	----	250	1.0	100
PROBLEM A	10	240	1.0	100
STANDAR	100	150	1.0	100

*

**

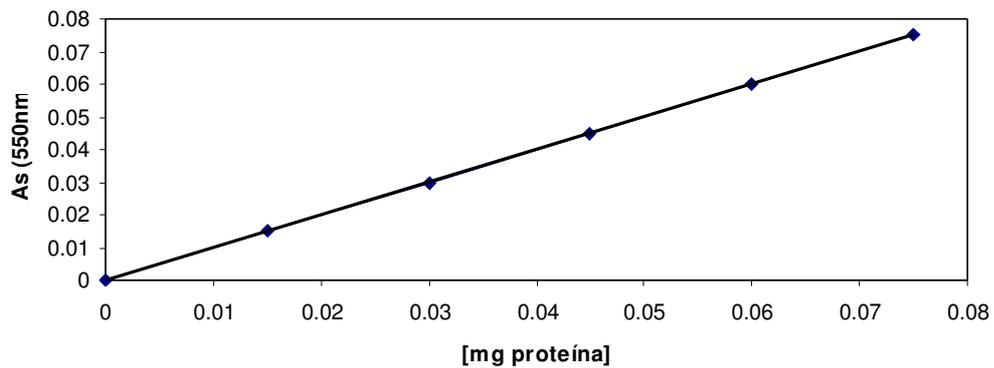
* Mezclar e incubar 10 minutos a T.A.

** Mezclar e incubar 45 minutos a T.A.
Leer a 550nm.

CURVA ESTANDAR

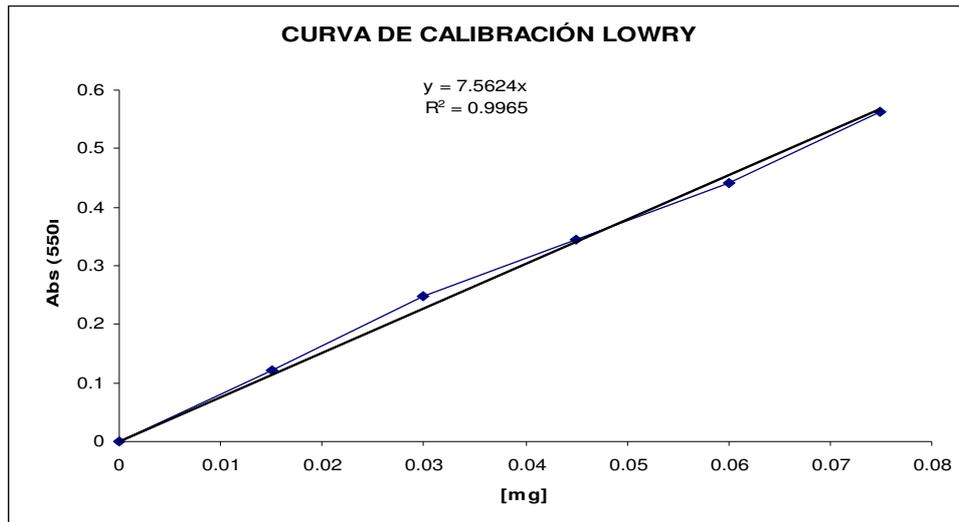
[mg proteína]	As	As'	Media
0	0	0	0
0.015	0.11	0.11	0.11
0.03	0.233	0.23	0.2315
0.045	0.352	0.349	0.3505
0.06	0.454	0.452	0.453
0.075	0.527	0.541	0.534
$\Sigma=0.225$			$\Sigma=1.679$

CURVA ESTANDAR DE PROTEÍNAS (LOWRY)



$$\text{FACTOR} = \frac{0.225}{1.679} = \mathbf{0.1340}$$

[mg]	Abs
0	0
0.015	0.122
0.03	0.249
0.045	0.345
0.06	0.441
0.075	0.564



ANEXO V

DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO (REACCIÓN CON DINITROFENILHIDRAZINA)

Preparación de reactivos:

DNPH 10mM EN HCl 2.5M

2,4,dinitrofenilhidrazina PM = 198.1

198.1g	—	1000mM	
1.98g	—	10mM	1000ml
0.495g	—		250ml

HCl 2.5M

36.46g	—	1.0M	
91.15g	—	2.5M	1000ml

37g	—	100ml
91.15g	—	246.35 ml

246.35 ml	—	1000ml
61.58 ml	—	250 ml

GUANIDINA HIDROCLORADA 6M EN FOSFATO DE POTASIO 20mM pH 2.3

PM= 95.53g

95.53g — 1.0M
 91.15g — 6.0M — 1000ml
 143.38g ————— 250 ml

FOSFATO DE POTASIO 20mM

PM= 136.09

136.09 g — 1000mM
 2.72g — 20mM — 1000ml
 0.68g ——— 250ml

ACIDO TRICLOROACETICO AL 20 % Y AL 10%

20g — 100ml
 50g — 250ml

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN ACETATO DE ETILO-ETANOL

acetato de etilo : etanol 1 : 1

Procedimiento:

TUBO	PLASMA (μ L)	DNPH 10 M (μ L)	HCl 2.5 M (μ L)
BLANCO	100/50	-----	1000/500
PROBLEMA	100/50	1000/500	-----

- 1.- Incubar 1 hora a obscuras, agitando cada 15 minutos.
- 2.- Agregar 1 mL (500 μ L) de TCA al 20%,
- 3.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- 4.- Tirar el sobrenadante, dejando únicamente la pastilla.
- 5.- Agregar 1 ml (500 μ L) de TCA al 10% y disolver la pastilla.
- 6.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
- 7.- Tirar el sobrenadante, dejando únicamente la pastilla
- 8.- Agregar 3 mL (1.5mL) de la solución de extracción etanol-acetato de etilo y disolver la pastilla
- 9.- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm
- 10.- Retirar el sobrenadante y secar perfectamente las pastillas.

- 11.- Disolver la pastilla en 1 ml (500 μ L) de Guanidina
- 12.- Incubar 10 min a 37° C.
- 13.- Leer a 370 nm, utilizando, guanidina para calibrar.

ANEXO VI

DIENOS CONJUGADOS

Reactivos:

- Mezcla de cloroformo:metanol (2:1)
- Corriente de nitrogeno (cromatográfico (99.998%))
- Ciclohexano

Procedimiento:

Fantasmas	H ₂ O	Clorof:metanol
30 μ L	170 μ L	1300 μ L

1. Mezclar en el vortex durante 2 minutos

2. Centrifugar a 4000rpm durante 10 minutos a 20°
3. Tomar 500 μL de la fase orgánica, sin tocar la capa amarilla
4. Evaporar a sequedad (calentar a 37°C en la campana) en corriente de nitrógeno.
5. Resuspender en ciclohexano, mantener los tubos tapados y a oscuras.
6. Se determina la absorbancia a 234nm utilizando para los cálculos un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (Prior y Castle, 1984)