



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

Comparación de los niveles de Tiorredoxina; una proteína redox, en eritrocitos de sangre de cordón umbilical de neonatos pretérmino y a término

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

Marcelo Rodolfo Sánchez Alvarez



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND**

VOCAL: **Profesor: ELENA ZAMBRANO GONZALEZ**

SECRETARIO: **Profesor: CLAUDINE LILIANE IRLES MACHUCA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: EUCLIDES AVILA CHAVEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

ASESOR

Claudine Liliane Irlles Machuca

SUSTENTANTE

Marcelo Rodolfo Sánchez Alvarez

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)	3
TIORREDOXINA (Trx1).....	8
BIOQUIMICA REDOX DE Trx1	8
ANTIOXIDANTE	10
COFACTOR	10
EXPRESIÓN DE Trx1	11
ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO.....	16
ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ERITROCITO NEONATAL	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVO	22
HIPÓTESIS	22
JUSTIFICACIÓN.....	22
SUJETOS Y MÉTODO	23
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

El estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de varias complicaciones de la prematuridad. Dentro del útero el desbalance redox debido a estrés podría disminuir la reserva antioxidante fetal. La tiorredoxina1 (Trx1) es una proteína reductora de disulfuros con varias funciones biológicas.

El objetivo de esta tesis fue comparar los niveles de expresión de Trx1 al momento de nacer de infantes a término y pretérmino.

Métodos: Los niveles de expresión de Trx1 fueron medidos en eritrocitos de vena de cordón umbilical en 12 infantes que nacieron a término con edad gestacional 37-40 semanas, peso al nacer 2585 – 4195g y 15 infantes que nacieron pretérmino con edad gestacional 25-36 semanas con peso al nacer 934 – 2494g. Las muestras de sangre fueron colectadas de cada sujeto, una purificación de etanol/cloroformo se utilizó para extraer la enzima Trx1. La proteína total que sobrevivió al procedimiento de extracción etanol/cloroformo fue medido por el método de Bradford.

Resultado: La media \pm error estándar en unidades arbitrarias de los niveles de expresión de Trx1 en eritrocitos fueron mayores en recién nacidos pretérmino (164.52 ± 102.04) en comparación con los neonatos a término (130.80 ± 118.0) probabilidad <0.05 .

Conclusión: Nuestros resultados podrían promover la especulación de que recién nacidos pretérmino nacen con más abundante Trx1 que recién nacidos a término. Altos niveles de Trx1 en estos neonatos pueden proveer un mecanismo protector único que permite el mantenimiento del balance redox durante la transición fetal a neonatal.

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo se describe como un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la habilidad de sistemas antioxidantes para destruirlos. Este se puede desarrollar por un aumento en la producción de ERO y/o una disminución en la capacidad antioxidante. Algunos ERO son radicales libres y ellos inducen daño celular actuando sobre proteínas y lípidos. El embarazo *per se* es un estado de estrés oxidativo, resultado del incremento en la actividad metabólica de mitocondrias de la placenta y un reducido poder destructor de antioxidantes. Este incremento de estrés oxidativo puede luego afectar la función de la placenta.

El desarrollo neonatal ocurre en un ambiente mucho mas hipóxico; la concentración de oxígeno en útero es menor al 3%, mientras que los niveles de oxígeno que inhalamos son de 21%. Al nacer, los infantes recién nacidos son por lo tanto repentinamente expuestos a mayores niveles significativamente de oxígeno inspirado. Los bebés deben también soportar la generación de radicales de oxígeno tóxicos, los cuales pueden oxidar macromoléculas críticas. Un mecanismo protector ocurre durante el último trimestre de vida fetal, en el sentido de incrementar la cantidad de enzimas antioxidantes, preparando adecuadamente al recién nacido para hacer frente al aumento de oxígeno al nacer. Sin embargo, los infantes prematuros frecuentemente sufren de lesiones oxidativas, debido a su insuficiente habilidad para protegerse contra insultos oxidativos.

Los eritrocitos tienen una amplia gama de factores antioxidantes los cuales protegen a los tejidos de ataques por ERO, generados tanto por la auto-oxidación de hemoglobina o por fuentes externas. ERO son destruidos dentro de los eritrocitos por la actividad combinada de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Las especies oxidantes no sólo participan en la toxicidad, pero también en una variedad de funciones fisiológicas controladas por el balance oxidante/antioxidante.

La tiorredoxina1 (Trx1) es la principal disulfuro reductasa celular. Además de actuar como un antioxidante por sí misma, Trx1 regula la expresión de otros importantes genes antioxidantes, activa enzimas que contienen sulfhidrilos (-SH) que son inactivadas por estrés oxidativo y suministra equivalentes reductores a peroxirredoxinas.

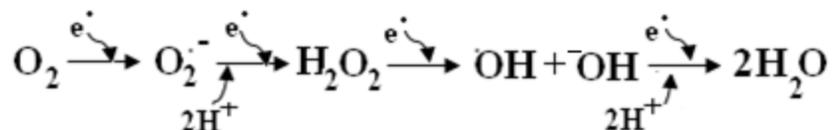
El objetivo de esta tesis es entonces comparar los niveles de expresión de Trx1 en eritrocitos de bebés a término y pretérmino, como una medida de la capacidad antioxidante de ambos recién nacidos.

MARCO TEÓRICO

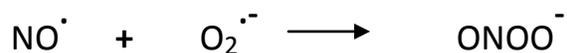
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Un radical libre se define como cualquier átomo o molécula que contiene electrones desapareados y tiene una existencia independiente. ERO es un término colectivo, que incluye no sólo a los radicales de oxígeno, superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), y peróxilos, sino también a algunos radicales derivados de oxígeno (no radicales) como el oxígeno singulete (1O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este término en la literatura a menudo incluye óxido nítrico (NO^{\cdot}), peroxinitrito ($ONOO^-$) y otras especies reactivas de nitrógeno (ERN). Por lo tanto, todos los radicales de oxígeno son ERO, pero no todos los ERO son radicales de oxígeno.¹

La reducción paso a paso de oxígeno molecular vía transferencia de un electrón se resume como sigue:



Uno de los más tóxicos radicales, el peroxinitrito ($ONOO^-$) es formado por óxido nítrico (NO^{\cdot}) y superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como describimos a continuación:



Muchas especies reactivas (como tal $^{\cdot}NO$, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HOCl$ y $ONOO^-$) son permeables a la membrana, y como resultado, son potencialmente capaces de difundirse fuera de la membrana plasmática. Esto parece particularmente relevante para $^{\cdot}NO$, H_2O_2 y $HOCl$, quienes tienen relativamente larga vida media en solución acuosa (de segundos para $^{\cdot}NO$ a minutos para H_2O_2 y $HOCl$).² ERO son generados como bi-productos de respiración aeróbica y metabolismo. Las células producen continuamente ERO como resultado de reacciones de transferencia de electrones, y rápidamente reaccionan con moléculas celulares, ya sea dañándolas directamente o comenzando una reacción en cadena donde el radical libre pasa de una molécula a otra, resultando en daño masivo a estructuras celulares.²

Los radicales libres y especies no-radicales reactivas derivadas de radicales existen en células y tejidos biológicos a bajas pero medibles concentraciones. La evidencia indica

que los organismos vivos están adaptados para coexistir con ERO. Su concentración está determinada por el balance entre su velocidad de producción y su velocidad de eliminación por varios componentes antioxidantes y enzimas.²

El sistema antioxidante de organismos vivos está constituido por una variedad de enzimas, proteínas de enlace, micronutrientes, catabolitos, vitaminas y compuestos químicos, que controlan las reacciones redox suscitadas por el consumo de oxígeno y otros oxidantes.^{1,2,3}

Un antioxidante es: "alguna sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo de una molécula blanco."¹

El antioxidante depende de las especies reactivas y la molécula blanco en cuestión.^{1,4}

El desbalance entre la producción y la destrucción de ROS, que conduce a inevitable daño celular, se conoce como estrés oxidativo y ocurre debido a un cambio en uno o más de los siguientes factores:^{1,2}

- altas concentraciones de ERO, formados durante condiciones patológicas y que pueden abrumar las defensas celulares conduciendo a daño celular
- capacidad disminuida para detoxificar agentes oxidantes
- deficiencias en los mecanismos de reparación que incluyen degradación y re-síntesis de moléculas dañadas o reducción del componente oxidado.

Una amplia gama de equilibrios interconectados forman el balance antioxidante/oxidante existente en todos los compartimentos biológicos aunque los mecanismos de control son poco conocidos.³

El término "sustrato oxidable" incluye casi cualquier molécula que se encuentra *in vivo*. A pesar de que teóricamente cualquier molécula puede ser dañada oxidativamente, los investigadores se han enfocado a las proteínas y los lípidos por constituir los principales componentes de los fluidos y tejidos corporales.⁴ Parece que los factores más importantes que determinan cual proteína o lípido va a ser oxidado son la constante de velocidad para la reacción de especies reactivas con proteínas y lípidos así como la abundancia de estas macromoléculas.⁴ Indudablemente, otros factores como la localización de especies reactivas y el blanco, la ocurrencia de reacciones en cadena y los efectos de procesos de reparación también afectan la reactividad de oxidantes.

Las proteínas son los principales blancos para oxidantes como resultado de su abundancia en sistemas biológicos, y su mayor constante de velocidad para la reacción.⁴

Una de las más distinguidas características de los diferentes compartimentos celulares es su potencial redox. En general, el potencial redox describe la tendencia de un sistema a tanto ganar o perder electrones cuando se introducen nuevas especies.⁵

No obstante, los oxidantes han sido tradicionalmente considerados como moléculas tóxicas con efectos perjudiciales para las células, varios estudios sugieren que estas especies reactivas podrían ser producidas por las células a propósito, y estas participan en procesos de señalización, especialmente a través de modificaciones del estado de oxidación de residuos de proteínas.^{1,2,3} El estrés oxidativo puede causar modificaciones

reversibles y/o irreversibles de proteínas sensibles, lo primero siendo crucial en la protección contra daño irreversible y modulación de la función de la proteína (regulación redox). Modificaciones irreversibles están generalmente asociadas con pérdida de la estabilidad de las funciones conduciendo a degradación de la proteína modificada.³

Las células deben mantener el ambiente intracelular reducido. El concepto de regulación redox nos indica que a pesar del ambiente intracelular generalmente reducido, las especies oxidadas pueden también existir. La formación reversible de disulfuros inter- o intra-moleculares (P-S-S-P) es frecuentemente un prerrequisito para la apropiada función y doblez de una proteína o un complejo de proteínas. Como la oxidación es mas a menudo debida al incremento del flujo (principalmente exógeno) de ERO, parece natural que la regulación redox actúe ante todo como un mecanismo de respuesta a este estrés oxidativo.⁵

Las actividades complejas de ERO y ERN están gobernadas por leyes químicas.³ En particular, ya que ERO y ERN son potentes electrófilos ellos reaccionan con centros nucleofílicos como grupos -OH (hidroxilo), -NH₂ (amino) y -SH (sulfhidrilo), de pequeños compuestos y macromoléculas con consecuencias reversibles o irreversibles (si el daño no es prontamente remediado), controlado por el equilibrio antioxidante/oxidante. El grupo -SH, por la particular posición del azufre(S) en la tabla periódica, es el mejor nucleófilo. Consecuentemente, tioles (RSH) son más fácilmente oxidados o conjugados que compuestos que tienen restos -OH o -NH₂.³

El potencial redox del citosol de células eucariotas normalmente favorece grupos tío reducidos. Junto con otros antioxidantes, RSH tanto de bajo y alto peso molecular están involucrados en la regulación celular de la actividad y concentración de ERO y ERN.

Proteínas con grupos sulfhidrilo (PSH) se dividen en categorías esenciales y no esenciales. Varios estudios químicos, genéticos y enzimáticos han clarificado el papel de PSH esenciales, como centros redox cisteína implicados en catálisis, estructura cuaternaria, traducción de señales y enlace al DNA. Las PSH no esenciales se consideran simples sitios nucleofílicos. Dentro de las células, niveles de tioles no proteínicos (NPSH; principalmente glutatión (GSH)) son mucho menores (2-6mM) que la población altamente heterogénea de PSH (20-40mM).³

Tioles cisteína pueden ser oxidados en ácido sulfénico (SOH), sulfínico (SO₂H), ó sulfónico (SO₃H); también puede conducir a la formación de enlaces disulfuro intra- o interproteína y a S-tiolación, que consiste en la formación de mezclas de enlaces disulfuro entre los tioles libres de una proteína y un tío de bajo peso molecular como la cisteína (S-cisteinilación), cisteamina (S-cisteaminilación), o glutatión (S-glutationilación). Además de estas oxidaciones, las cisteínas pueden someterse a nitrosilación en presencia de ERN. La S-nitrosación ó S-nitrosilación es una agregación oxidativa post-translacional de NO a residuos cisteína de proteínas. Una paradoja de la S-nitrosilación es que solo un pequeño conjunto de cisteínas reactivas son modificadas *in vivo* a pesar de la promiscua reactividad que exhibe el NO con tioles, excluyendo la reacción de NO libre como el mecanismo primario de S-nitrosilación.^{3,6} Sin embargo, no todas estas modificaciones por oxidación están involucradas en mecanismos de regulación redox. Uno de los principales

criterios que permite considerar estas modificaciones post-translacionales como mecanismos regulatorios y no sólo como daño oxidativo es su reversibilidad.⁸ En sistemas biológicos, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son altamente específicas con respecto al grupo tiol involucrado.⁵

El papel de ERO en la señalización celular es bien conocido. Destacan las cualidades de H_2O_2 como un adecuado segundo mensajero por su producción y degradación enzimática que proveen especificidad de tiempo y espacio, y su interacción química que da especificidad para oxidación de tioles. Productos de peroxidación de lípidos (particularmente del 4-hidroxi-2-nonenal (HNE)), y óxido nítrico (NO), también participan en la señalización.^{9,7} Este último ejerce sus efectos vía mecanismos de formación de cGMP así como independiente de cGMP tal como nitración y nitrosilación de proteínas.⁷ La participación de PSH puede ser incluso más compleja tal como se indica mediante una comparación de las reacciones por $ONOO^-$ y H_2O_2 . Mientras que $ONOO^-$ reacciona más rápidamente (alrededor de tres veces) que H_2O_2 con tioles, prefiriendo RSH no disociados, mientras que H_2O_2 reacciona más fácilmente con RS^- (ion tiolato).³

Un sorprendente gran número de proteínas celulares (4-5% del extracto de proteínas de células de linfoblasto L1210) contienen tioles vecinos cerca a o en la superficie de las proteínas. Proteínas con tioles vecinos tienen cisteínas sulfhidrilo que están dentro de una distancia de enlace. Esta localización de los disulfuros permite la reducción por interacción proteína-proteína.⁸

Aunque los sistemas antioxidantes pueden hacer frente a grandes cantidades de ROS, ellos no son perfectos. Por lo que la célula está equipada con sistemas “especialistas de rescate” en caso de que los “guardaespaldas” fallen en la protección de “estructuras VIP” en peligro de estrés oxidante.⁶ Las principales disulfuro reductasas universales responsables de mantener las proteínas en su estado reducido son Trx1 y glutarredoxina (Grx). Trx1 comúnmente excede el nivel de Grx en la célula.^{6,9}

Otro sistema, el Glutatió (GSH), no es particularmente un efectivo reductor de proteínas oxidadas. Aun en la presencia de glutarredoxina(s), GSH reduce principalmente mezclas disulfuro glutatió-proteína y sólo unos pocos selectos disulfuros intra-proteína. La reducción de estos disulfuros dentro de las células se debe principalmente a la actividad del sistema tiorredoxina.^{9,10}

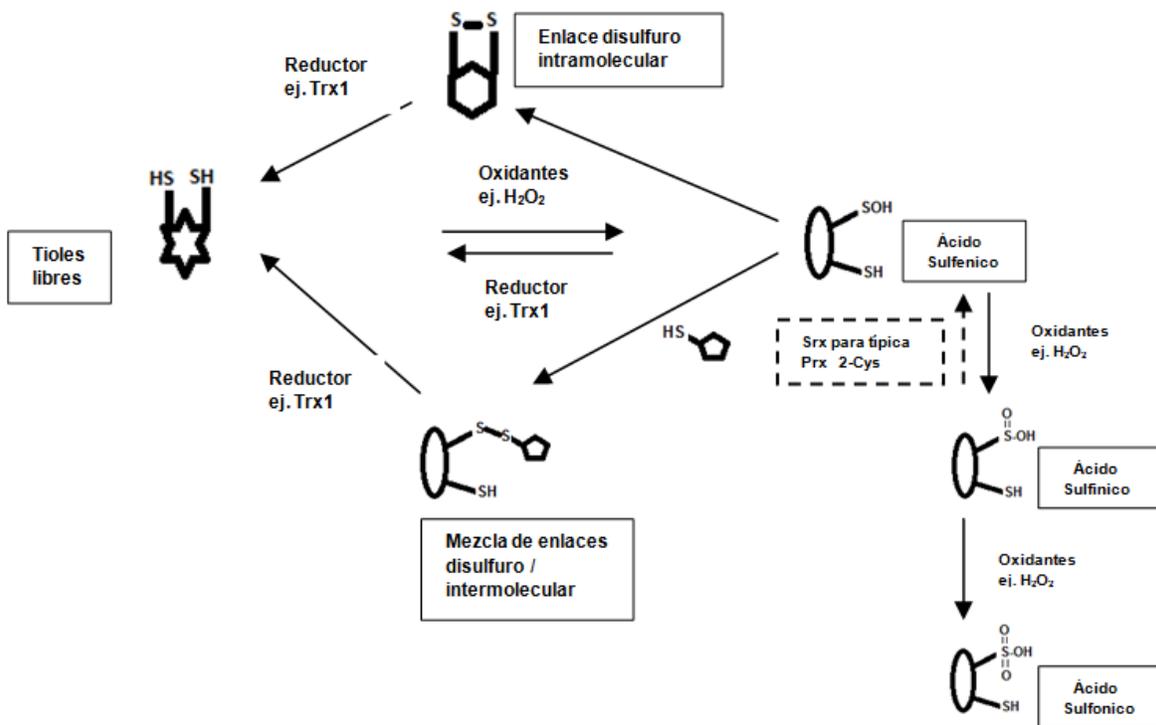


Figura 1.

Modificaciones oxidativas tiol. La exposición de residuos cisteína sensibles redox a oxidantes como tal H₂O₂ conduce a la formación reversible de ácido sulfénico, este último reacciona rápidamente con tioles cercanos de la misma proteína para formar enlaces disulfuro intramoleculares. Puede también reaccionar con tioles de otras proteínas o el tripéptido pequeño glutatión para formar mezclas de enlaces disulfuro ó enlaces disulfuro intermoleculares. Las cisteínas reducidas pueden ser directamente oxidadas a enlaces disulfuro por reacciones de intercambio disulfuro con glutatión oxidado. Estas modificaciones oxidativas tiol son reducidas por miembros de los sistemas Grx o Trx, quienes adquieren su poder reductor de NADPH celular. En la presencia de altos niveles de H₂O₂, sobreoxidación a ácido sulfinico o ácido sulfónico puede ocurrir. Mientras que Sulforredoxina (Srx) específicamente reduce acido sulfinico en 2-Cys Prx's. Modificado de Kumsta Caroline and Jakob Ursula; Redox-Regulated Chaperones Biochemistry 2009;48:4666-4676

TIORREDOXINA (Trx1)

La proteína Trx1 es el miembro epónimo de las proteínas de la familia Tiorredoxina. Las principales isoformas son: Trx1 (citoplásmica/nuclear) y Trx2 (mitocondrial). Proteínas que comparten la secuencia del sitio activo similar a Trx1: Cys-Xxx-Yyy-Cys se les llama miembros de la familia Tiorredoxina. Esta familia ahora incluye más de 10 proteínas.^{5,9,11,12,13} El número indica el orden cronológico de su descubrimiento.

Las actividades antioxidantes de todas las formas de Trxs están claramente relacionadas a su contenido tiol, particularmente en su sitio activo. La cuestión de porque algunas de estas proteínas estructuralmente similares actúan como reductores, mientras que otras son oxidasas más eficientes se debe al papel principal de los dos residuos localizados entre las dos cisteínas del sitio activo. La naturaleza y composición de estos dos aminoácidos afecta dramáticamente el potencial redox estándar de las proteínas.¹⁴

En 1964, la pequeña proteína (Trx-1) fue identificada por Peter Reichard y su grupo como una donadora de hidrógenos a ribonucleotido reductasa, quien es una enzima esencial para la síntesis de DNA en *Escherichia coli*. El nombre Tiorredoxina, se le dio a la proteína a partir de su función biológica dependiente sobre el ciclo oxidación-reducción de un grupo disulfuro (S-S).¹³ El primer reporte de Trx1 en mamíferos fue en 1967 como una proteína redox presente dentro de células de hepatoma Novikoff de rata. Trx1 fue subsecuentemente redescubierta bajo otros nombres: citocina parecida a interleucina-1, factor derivado de células T adultas leucémicas (ADF), y como factor de embarazo temprano. Se demostró que estas proteínas eran idénticas cuando la correcta secuencia de aminoácidos de Trx1 fue publicada, y todas ellos ahora son referidas como Trx1.^{11,14}

Trx1 tiene efectos pleiotrópicos funcionando como un antioxidante celular protector y regulador de actividad de factores de transcripción. Tiene un amplio rango de actividades en diferentes compartimentos celulares; participa en la reducción de ribonucleótidos a deoxirribonucleótidos para síntesis de ADN y, por mantener grupos tiol en el estado reducido, modula actividad de citocinas y tiene influencia sobre el crecimiento celular y apoptosis.^{6,11,14,16}

Nos enfocaremos en esta tesis a las propiedades redox y antioxidantes de Trx1 de humano.

BIOQUIMICA REDOX DE Trx1

Estructura-función

La Trx1 de humano es una proteína redox de 104 aminoácidos con un peso molecular de 11,737 Da, proveniente del gen TXN 9q32.^{11,13} Esta pequeña proteína ditiol (-(SH)₂) universal es una de las más importantes reguladoras del balance oxidación-reducción (redox) celular. Se considera como la disulfuro reductasa universal.^{5,11,13}

La Trx1 es una proteína globular compacta, la cual contiene cinco hebras de hojas β -plegadas formando un corazón hidrofóbico rodeado de cuatro α -hélices en la superficie externa, utiliza los dos residuos cisteína con actividad redox en su sitio activo con la secuencia conservada –Trp-Cys32-Gly-Pro-Cys35- que está localizado sobre una saliente entre la hebra β 2 y la hélice α 2. Solamente el azufre N-terminal de Cys32 está expuesto al solvente.^{5,11} El paso que limita la velocidad de la actividad de Trx1 es la orientación de cisteína del sitio activo N-terminal y las dos cisteínas con enlace disulfuro del sustrato en un ángulo de 180°. El tiol del sitio activo N-terminal de Trx1 posee un inusual menor valor de pK_a . Por lo tanto, este grupo tiol es rápidamente desprotonado bajo condiciones fisiológicas.¹¹ La Trx1, tiene tres cisteínas, Cys62, Cys69, y Cys73, además del par de su sitio activo (Cys32 y Cys35). Dos conjuntos de tioles vecinos y un monotiol (Trx-(SH)₂-(SH)₂-SH), cada uno de los cuales han sido implicados en otras actividades reductoras. Estos residuos Cys podrían impartir propiedades biológicas únicas.^{5,11,16}

El mecanismo propuesto para la reducción de proteínas disulfuro catalizado por tioredoxina es: tioredoxina reducida (Trx-(SH)₂) se enlaza a la proteína blanco vía su área superficial hidrofóbica, el ataque nucleofílico por el tiolato del residuo Cys32 resulta en la formación de una mezcla disulfuro pasajero, quien es seguido por un ataque nucleofílico del residuo Cys35 desprotonado generando tioredoxina oxidada (Trx-S₂) y la proteína reducida (ocurren cambios conformacionales en tioredoxina y proteína blanco durante la reacción).^{5,11,112,13} La tioredoxina oxidada (Trx-S₂) es reducida por la flavoproteína tioredoxina reductasa1 (TrxR1) dependiente de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) que juntos comprenden el sistema tioredoxina. La fuente de electrones del sistema Tiorredoxina es NADPH, quien en mayor parte se produce de la vía pentosas fosfato. Los electrones son transferidos de NADPH a FAD, luego al disulfuro activo redox N-terminal en una de las subunidad de TrxR-1, y finalmente al sitio activo Gly-Cys-Sec-Gly C-terminal de la otra subunidad (donde Sec es selenocisteína).^{5,11,15}

El método de Western blotting “redox” se utilizó para medir el potencial redox de Trx1 y se encontró que dentro de células endoteliales, virtualmente toda la Trx1 está en la forma reducida, y no solo bajo condiciones normales. Aun seguido de un tratamiento con H₂O₂, el 70-85% de Trx1 total permanece completamente reducida. Aprovechando este método y utilizando anticuerpos para Trx1, se determinó el potencial redox estándar (E_o) de Trx1 (-230mV) para cuantificar el estado redox de Trx1 en el citoplasma y núcleo. Se encontró que el 95% de Trx1 está en el estado reducido en ambos compartimentos (potencial redox (E_h) es -280mV).^{11,16}

Trx1 humana forma dímeros vinculados covalentemente en solución, especialmente en la presencia de un oxidante o cuando se almacena a altas concentraciones. Esto se debe a un pedazo hidrofóbico de 1100Å², cinco enlaces hidrogeno, y un enlace disulfuro (Cys73-Cys73). La región hidrofóbica está compuesta de 12 aminoácidos hidrofóbicos. Se desconoce si la formación de dímeros de Trx1 ocurren bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, se conoce que dímeros de Trx1 no son sustrato para la reducción de TrxR1. Trx1 también forma heterodímeros con numerosos regiones de proteínas redox. Las interacciones entre los péptidos y Trx1 sugieren que hay especificidad para las interacciones, pero las constantes de disociación para todos los heterodímeros no se ha reportado.¹⁷

La participación de la Trx1 en catalizar reacciones de trans-nitrosilación en células podría ser general debido a que esta proteína tiene numerosas interacciones proteína-proteína. Se demostró que la Tiorredoxina S-nitrosilada (Trx-SON) es responsable de incrementar el contenido de proteínas totales de células endoteliales y las funciones anti-apoptóticas y redox de Trx1.¹⁸

ANTIOXIDANTE

Esta proteína parece tener un importante papel en proteger a las células de sustancias tóxicas, especialmente oxidantes y electrófilos. Trx1 actúa como un cofactor, y proteína reductora. Cada una de estas actividades tiene una influencia sobre la respuesta celular a insultos tóxicos, particularmente estrés oxidante.^{5,9,11,12,13,16,19} Se ha demostrado que la Trx1 tiene efectos antioxidantes tanto directos e indirectos. El efecto antioxidante indirecto es mediado por su habilidad de inducir la expresión del gen superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), así reduciendo el estrés oxidativo (impidiendo la formación ONOO⁻).^{9,16} De los efectos directos, se ha reportado que Trx1 es un poderoso extinguidor de oxígeno singulete y destructor de radical hidroxilo. Las cisteínas estructurales y catalíticas son importantes para su propiedad destructora de oxígeno reactivo¹⁹ además, puede reducir directamente H₂O₂ y GSSG.^{9,11}

El sistema tiorredoxina es capaz de regenerar proteínas inactivadas por estrés oxidativo. De hecho, se ha reportado que el sistema tiorredoxina podría contribuir en más del 50% para esta función.^{5,10}

COFACTOR

La metionina es uno de los dos aminoácidos comunes (junto con Cys) que son más susceptibles a oxidación por ERO, y por lo tanto sistemas enzimáticos participan para contrarrestar este daño.¹⁷ La Trx-1 dona electrones para metionina sulfoxido reductasas universales participando en la reparación de proteínas por reducción de residuos metionina sulfóxido. La oxidación de residuos metionina al sulfóxido por ROS, podría perjudicar la función de las proteínas, ó también podría regular la función de las proteínas por controlar el estado redox de residuos metionina críticos.¹⁷

La Trx-1 parece ejercer la mayor parte de sus propiedades antioxidantes dentro de las células a través de peroxirredoxinas (Prxs), quienes utilizan grupos tiol como equivalentes reductores para destruir oxidantes. Las células de mamíferos expresan 6 diferentes enzimas Prxs, un grupo de universales peroxidases dependientes-tiol que participan no sólo en la defensa contra daño oxidante por peróxido pero también en la regulación de eventos de señalización celular mediado por H₂O₂ en eucariotas. Se clasifican acorde al mecanismo de reducción de peróxido y al número de cisteínas involucradas en la catálisis.^{20,21}

Todas las enzimas Prxs contienen un residuo cisteína conservado (peroxidatic cysteine, C_P). Cuatro tipos de Prxs (Prx1-Prx4) contienen un residuo cisteína conservado adicional (resolving cysteine, C_R). Las enzimas Prxs que contienen dos residuos conservados son así designadas 2-Cys Prxs, mientras que Prx6 es referida como tal 1-Cys Prx debido a que esta solo contiene la C_P.^{20,21} Dentro de las enzimas 2-Cys Prxs, quienes son homodimeros, C_P-SH de una subunidad es selectivamente oxidada por peróxidos a C_P-SOH (ácido sulfénico), quien luego reacciona con C_R-SH de la otra subunidad para producir un enlace disulfuro intermolecular, quien es reducido por Trx1, cerrando el ciclo. La Trx1 es en turno reducida por TrxR1 dependiente de NADPH.^{20,21}

EXPRESIÓN DE Trx1

La concentración de Trx1 humana en tejidos no se ha determinado exactamente pero es alrededor de 0.5-5.0 μ M en tejidos de bovino.^{5,17} La Trx1 es inducida por una variedad de estresantes, incluyendo agentes infecciosos así como hormonas y químicos. Algunos ejemplos son la hipoxia, mitógenos, lipopolisacáridos, O₂, H₂O₂, ester forbol, infección viral, radiación con rayos X, e irradiación UV. La expresión de Trx1 también es inducida por estímulos sin las llamadas propiedades de estrés. Es inducida por retinol (vitamina A), estradiol o prostaglandina E1 (PGE1) y Geranilgeranilacetona (GGA), sulfurofano.^{9,12}

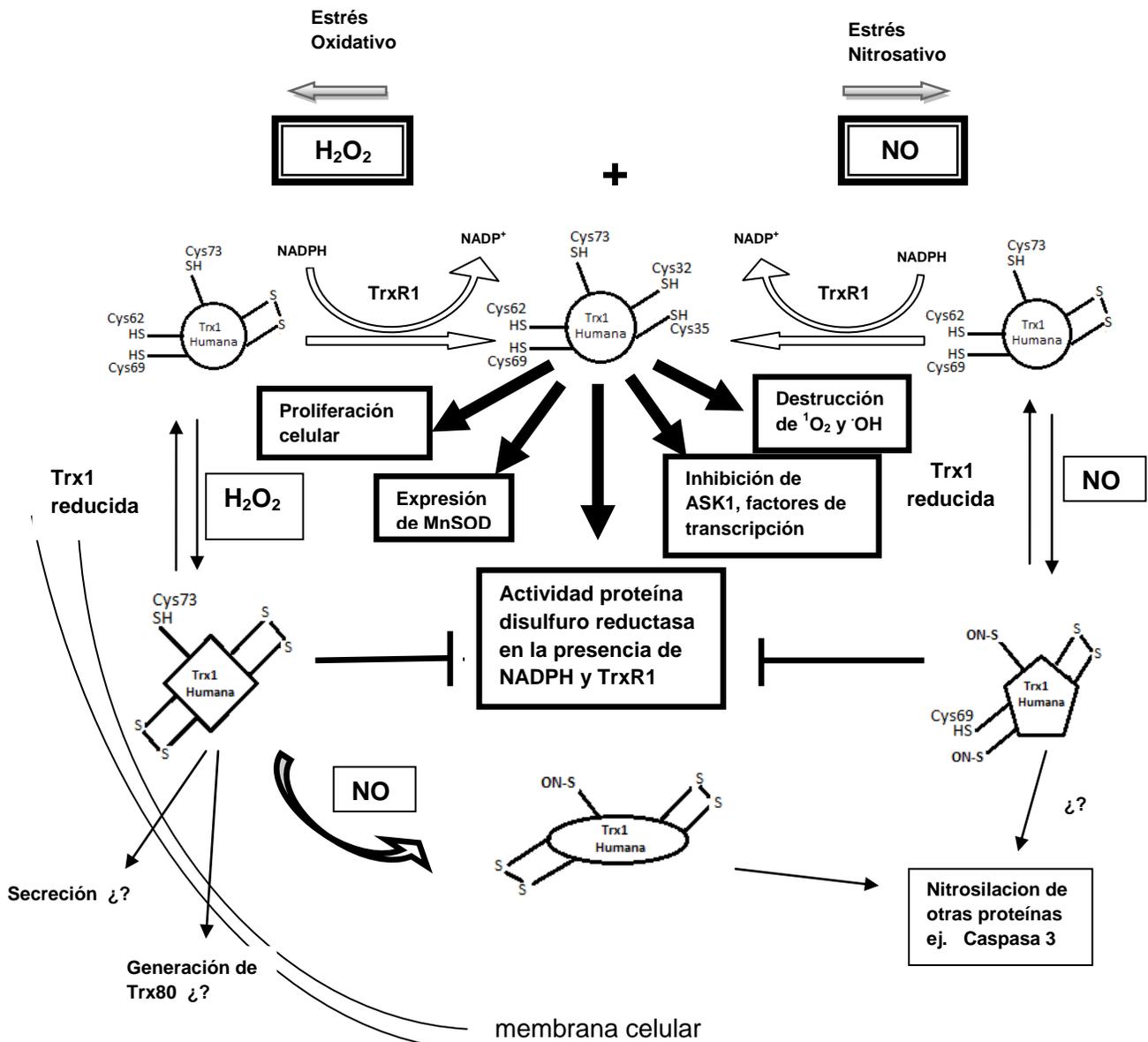


Figura 2. Representación esquemática del sistema redox Trx y sus principales funciones. La forma reducida de Trx1 protege contra lesión celular inducida por estrés oxidativo y apoptosis. La protección contra estrés oxidativo se puede lograr directamente a través de la destrucción de ERO, incrementando la expresión de MnSOD, o eliminación de peróxidos a través de la acción de Prx's. Además Trx1 reducida puede también inhibir ASK1, resultando en la anhibición de apoptosis. Trx1 puede también influenciar la reparación o regeneración de tejido dañado por incrementar la regeneración celular. Por otra parte, Oxidación y S-nitrosilación de Trx1 citosólica por H₂O₂ y GSNO, respectivamente. Bajo condiciones oxidantes, dos disulfuros pueden formarse en la estructura de Trx1: uno en el sitio activo y el segundo entre las cisteínas estructurales Cys62 y Cys69. Esta modificación de Trx1 probablemente conduce a cambios conformacionales los cuales están involucrados en la secreción de Trx1 o la formación de Trx80. Además, se ha mostrado que esta forma de Trx1 puede ser nitrosilada en Cys73, por lo tanto, esta involucrada en procesos transnitrosilación con caspasa 3. Siguiendo el estrés nitrosativo, un disulfuro se forma en el sitio activo, y las dos Cys estructurales Cys69 y Cys73 son nitrosiladas. Esta forma de Trx1 esta también probablemente involucrado en procesos de transnitrosación. La formación de dos disulfuros o dos nitrosotioles conduce a la inhibición de la actividad catalítica del sistema Trx. Este efecto es reversible, y la actividad de Trx se regenera vía un mecanismo autocatalítico. Modificado de Hashemy Seyed Isaac and Holmgren Arne; **Regulation of the Catalytic Activity and Structure of Human Thioredoxin 1 via Oxidation and S-Nitrosylation of Cysteine Residues** The journal of biological Chemistry 2008;283:21890-21898 y Kumuda C. Das; **Thioredoxin System in Premature and Newborn Biology** Antioxid Redox Signal 2004;6:177-184

ERITROCITOS

El eritrocito, hematíe o glóbulo rojo circulante muestra tres características importantes 1) son células maduras, altamente diferenciadas para el transporte de los gases respiratorios, oxígeno y dióxido de carbono; 2) presentan una vida media limitada, y 3) han perdido la capacidad de efectuar mitosis, estas dos últimas determinan el que se generen continuamente (eritropoyesis), y que exista en el organismo un compartimento generador, que posee una porción fija (eritrón fijo), constituida por las células eritropoyéticas relativamente fijas en los órganos eritropoyéticos, y una porción circulante (eritrón circulante), representada por los reticulocitos y los eritrocitos maduros de la sangre.²¹ Los eritrocitos están entre los tipos celulares más abundantes en un cuerpo humano (comprende aproximadamente un cuarto del número de células totales en adultos). Cada día más de 200 billones de eritrocitos necesitan ser reemplazados.²²

Durante su tiempo de vida los eritrocitos están expuestos a varias situaciones de estrés. En promedio ellos pasan una vez por minuto por los pulmones donde se exponen a estrés oxidativo. Más de una vez por hora pasan a través de la medula del riñón donde se enfrentan a shock osmótico. Los eritrocitos se exprimen a través de los capilares que son más pequeños que ellos mismos.²⁸ Así, los eritrocitos experimentan una variedad de continuo daño físico y metabólico a medida que envejecen, como tal vesiculación de la membrana, modificaciones en la hemoglobina (Hb) y fallas progresivas tanto en homeostasis celular y defensas antioxidantes.²³ Bajo circunstancias normales, todos los eritrocitos humanos viven aproximadamente 120 ± 4 días en el torrente sanguíneo, implicando la existencia de estrecho(s) mecanismo(s) de regulación molecular, responsable de la programación de la esperanza de vida y la no aleatoria eliminación de eritrocitos senescentes.²³

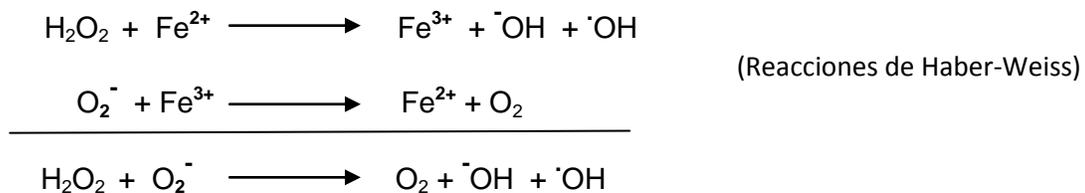
Los eritrocitos circulantes carecen de mitocondria y núcleo, elementos críticos en la maquinaria de apoptosis, por contables diferencias y similitudes a apoptosis, al conjunto de vías trabajando en conjunto dentro de los eritrocitos en respuesta a estrés (oxidativo, osmótico, etc.), se le llamó eriptosis para describir la muerte suicida de los eritrocitos. Los participantes moleculares, así como las vías de señalización involucradas, no se han clarificado completamente.²³ El envejecimiento del eritrocito está asociado con una disminución en la actividad de varias enzimas y con modificaciones en proteínas de membrana. En particular modificaciones en proteína banda 3 en membrana, por escisión proteolítica, agrupación o exposición de epítopes inusuales, desencadenando el enlace de anticuerpos específicos anti-banda 3 (IgG autólogo), marcando la eliminación de la célula. Ya que los eritrocitos no senescentes no enlazan anticuerpos anti-banda 3 y no son reconocidos por fagocitos, supuestos epítopes banda 3 no están disponibles para el enlace anticuerpo bivalente en dímeros nativos. Se ha demostrado que banda 3 es reconocida por anticuerpos autólogos específicos si la estructura cuaternaria es modificada por entrecruzamiento oxidativo de los dominios citoplasmáticos, con la consiguiente reorientación del dímero banda 3 y que IgG autólogo no reconoce dímeros banda 3 vinculados covalentemente generados no oxidativamente. Se ha concluido que

dimeros banda 3 entrecruzados por disulfuro son los mínimos agregados banda 3 que aumentan la afinidad de anticuerpos anti-banda 3.²⁴

A pesar de carecer de mitocondria, ERO son continuamente producidos dentro de los eritrocitos debido a la alta tensión O₂ en sangre arterial y su alta concentración de hierro en el hemo. La hemoglobina (que representa más del 95% de la proteína citoplasmática) es susceptible a oxidación por dos vías: en el grupo hemo, donde la oxidación de hierro ferroso produce metahemoglobina (metHb), y en la cadena lateral cisteína de la molécula globina. La oxidación de este ultimo produce enlaces disulfuro entre grupos sulfhidrilo de globina como causa potencial de la disociación del tetrámero en subunidades libres (cuerpos de Heinz y hemicromos). La predisposición de incrementada desnaturalización de hemoglobina y precipitación intracelular de la hemoglobina desnaturalizada puede resultar tanto de una anomalía intrínseca de la hemoglobina y de un defecto en detoxificar peróxido de hidrogeno.²⁵ El hierro en el hemo en deoxihemoglobina (deoxiHb) se encuentra en estado ferroso dentro de los eritrocitos. El enlace de oxígeno al hierro del hemo resulta en una deslocalización de electrones, con el enlace Fe(II)-O₂ estando en equilibrio con el enlace Fe(III)-O₂⁻. Ocasionalmente el anión superóxido es liberado en lugar del oxígeno, resultando en la auto-oxidación de hemoglobina a metahemoglobina (metHb) con hierro en el estado férrico, quien no puede enlazar oxígeno. El anión superóxido dismuta a H₂O₂.²⁶ La interacción de H₂O₂ con metales de transición principalmente Fe²⁺ y Cu⁺, produce radicales hidroxilo ([•]OH).



El Fe³⁺ puede ser transformado a Fe²⁺ por agentes reductores como lo es superóxido



Dentro de los hematíes, la auto-oxidación del 3% de la hemoglobina total a metHb se estima que ocurre cada día.^{20,26}

Se ha conocido por muchas décadas que estrés oxidativo conduce a oxidación de Hb y daño a la membrana del eritrocito. La desnaturalización de proteínas de membrana generalmente precede peroxidación de lípidos y consecuente fagocitosis. Varias investigaciones demostraron el papel clave de estrés oxidativo y liberación de hierro en una forma reactiva causando daño a las proteínas de membrana vía la reacción de Fenton y producción del radical hidroxilo. En la ausencia de protección eficiente por factores antioxidantes, estrés oxidativo es responsable de la liberación de hierro en forma reactiva, predisponiendo a los eritrocitos a hemólisis a través de la formación de antígeno senescente.²⁸ Quelantes de hierro capaces de entrar a la célula (ferrozina, quercetina)

previenen tanto la oxidación de proteínas de membrana y formación de antígeno senescente, una de las principales vías para eliminación del eritrocito. Aumento en la actividad proteolítica que ocurre en tejidos dañados también liberan hierro de proteínas de almacenaje.²⁷ La toxicidad del hierro es inversamente proporcional a la disponibilidad de ferritina para secuestrar y detoxificar ion ferroso, y directamente proporcional a la cantidad de peróxido de hidrogeno para producir radicales hidróxido por la reacción de Fenton.²⁷

Debido que la metHb es indeseable, los organismos necesitan sistemas redundantes para reducir su formación. Los eritrocitos carecen de la habilidad de reemplazar moléculas dañadas, dependen más que otras células sobre eficientes sistemas de desintoxicación: una carencia de enzimas protectoras en los eritrocitos daría lugar a un aumento de oxidación.^{27,28}

El eritrocito, cuya única función pareciera ser la de transportar y proteger a la hemoglobina (Hb), que es necesaria para incrementar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre, cuenta además con la habilidad de destruir ERO exógeno debido a la permeabilidad de su membrana a radicales de oxígeno y su alta actividad intracelular (comparado con otros tipos celulares) de sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y sistemas secundarios (proteasas). Además, mucha de la capacidad antioxidante no enzimática de la sangre entera está localizada dentro de los eritrocitos (GSH, Vitaminas A, C, y E). Hematíes circulando son por lo tanto destructores de radicales libres móviles y proveen protección antioxidante a otras células y tejidos.²⁸

Los eritrocitos de humanos recién obtenidos de la circulación no contienen peróxidos lípidos detectables u otros productos de autooxidación de lípidos. El hecho que la autooxidación es bloqueada in vivo, es indicativo de mecanismos antioxidantes protectores extremadamente eficientes. Impedimento de estos mecanismos podría estar asociado con estados hemolíticos. Los mecanismos antioxidantes de los eritrocitos pueden ser divididos en dos grupos. Algunos sistemas desintoxican radicales libres antes de que causen daño, otros son responsables de reparar el daño después de haber ocurrido.²⁵ La sangre interactúa con todos los órganos y tejidos y, consecuentemente, con muchas posibles fuentes de especies reactivas. Además, una multitud de sustratos oxidables están ya en la sangre. Por lo tanto, es posible asumir que estrés/daño oxidativo evaluado frecuentemente en sangre en cualquier intervención experimental deriva, al menos en parte, de la sangre.⁴

Muchos estudios en este campo examinan parámetros del plasma, relacionados a estrés oxidativo, que son rápidamente modificados por factores externos, mientras que estudios en eritrocitos, que son más estables y precisos, son todavía pocos y distantes entre sí.²⁹

La evaluación de enzimas antioxidantes en ambos compartimentos de sangre se realizó probablemente con la suposición que las mediciones en plasma reflejan los cambios sistémicos y mediciones en eritrocitos reflejan cambios intracelulares.²⁹ El plasma contiene $\pm 0.25 \mu\text{M}$ H_2O_2 , ya que este es continuamente producido en virtualmente todos los tejidos y se mezcla rápidamente con el plasma.⁴ Los procesos de reducción en plasma compiten con difusión y consumo dentro del eritrocito. Se ha estimado que alrededor de 55-60% del H_2O_2 en plasma termina siendo consumido dentro del eritrocito por el sistema Prx2/Trx1/TrxR1 y catalasa.²⁰

Parece razonable por lo tanto sugerir que los mecanismos de oxidación/reducción dentro del eritrocito podría también ser útiles en proteger otros tejidos de estrés oxidativo por remover radicales libres tóxicos.³⁰ Especies reactivas producidas en eritrocitos y especies reactivas circulando en plasma pueden tener un impacto sobre los constituyentes del eritrocito.⁴ Paradójicamente, se ha demostrado que la auto-oxidación de hemoglobina ocurre bajo hipoxia moderada. Hipoxia también parece inducir estrés oxidativo *in vivo*, y acidosis produce estrés oxidativo y lesión celular. Otras bien conocidas fuentes de estrés oxidativo en los eritrocitos son radicales libres producidos fuera de los eritrocitos por fagocitos activados, metabolismo endotelial, hiperoxia, isquemia-reperfusión, la cascada de ácido araquidónico y otras vías que producen ERO.²⁸

Alteraciones oxidativas y no-oxidativas podrían subsecuentemente causar anemia por hemólisis de eritrocitos circulando o un incremento de la eliminación esplénica de eritrocitos dañados o “presenil” de la circulación.³¹

El principal interés en examinar el estatus redox en eritrocitos es la influencia potencial que el estatus redox ejerce sobre la deformabilidad del eritrocito, así afectando su habilidad para transferir oxígeno a los tejidos.⁴

Un estudio encontró que existen factores de riesgo relacionados al eritrocito y que estos factores aparentemente participan en la regulación del estatus redox y estructura de la membrana del eritrocito. Niveles menores de proteínas sulfhidrilo, tioredoxina1, altos niveles de mezclas disulfuro entre proteínas en eritrocitos antes del tratamiento con una droga pro-oxidante (Ribavirin) que se utiliza en el tratamiento de hepatitis C, predice el desarrollo de anemia severa durante el subsecuente tratamiento con ribavirin.³¹

Aunque el estrés oxidativo podría dañar al eritrocito mismo, el efecto en masa de grandes cantidades de ROS saliendo de los eritrocitos teniendo un tremendo potencial para dañar otros componentes de la circulación. Así, es de especial interés determinar la magnitud de este desafío oxidativo y el balance ROS en el eritrocito.²⁶

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO

El proceso de nacimiento del bebé está acompañado por un incremento en agresión oxidativa tanto por el rápido cambio del relativamente hipóxico ambiente intrauterino al extrauterino y debido a la mediación de los diversos procesos fisiológicos involucrados en la finalización de la gestación. El feto intercambia un ambiente intrauterino que es hipóxico, con una PO_2 de 20-25 mmHg a otro con un mayor contenido de oxígeno, con PO_2 de 100mmHg. El aumento de cuatro o cinco veces el aumento en la tensión de oxígeno se cree que induce una mayor producción de ERO.^{28,29,38}

Aunque es lógico asumir que el neonato a término posee sistemas de defensa antioxidantes capaces de resistir el estrés oxidativo fisiológico resultado del proceso de nacer, esto no es tan claro en el caso del neonato pretérmino.³⁸

En neonatos pretérmino, el efecto de este ambiente oxidante se incrementa por varios factores: a) una concentración adecuada de antioxidantes podría estar ausente al nacer

ya que los aumentos en el desarrollo en capacidad antioxidante (transferencia por placenta materno-fetal, producción endógena) ocurren en la última parte de la gestación en la preparación para la transición a la vida extrauterina. b) la habilidad para incrementar la síntesis de antioxidantes en respuesta a hiperoxia o a otros desafíos oxidantes es deficiente c) tienen infección o inflamación d) tienen altos niveles de hierro libre que incrementa la reacción de Fenton.^{27,28}

En general, problemas de salud en infantes prematuros incrementan dramáticamente con disminución de peso y edad gestacional al nacer. Significa que prematuridad junto con la inmadurez de ciertos órganos, podría en si ser considerado como un estado patológico.³⁸

Esta deficiencia en la capacidad de defensa inmadura del neonato contra agresión por radicales libres es acompañado por el riesgo presente por terapia postnatal basado en oxígeno, una medida que es frecuentemente necesaria para mantener los niveles de PO₂ arterial dentro de límites normales.³⁸

Desde el punto de vista clínico, las anteriores consideraciones significan que el neonato prematuro es más vulnerable a la llamada “enfermedad de radicales de oxígeno de neonatología”. La idea es que el estrés oxidativo podría afectar diferentes órganos, a menudo simultáneamente, dando lugar a diferentes signos acorde al el órgano más afectado. Incluye, enfermedad de pulmón crónico, retinopatía del prematuro y enterocolitis necrotizante.³⁹

El embarazo per se es un estado de estrés oxidante resultado del incremento de la actividad metabólica en mitocondrias de la placenta y reducido poder destructor de antioxidantes en mujeres embarazadas versus no embarazadas de edad similar.^{40,41} Mientras que hay un gradual favorecimiento de actividad antioxidante sobre oxidación durante embarazo normal, hay un incremento insuficiente de antioxidantes para contrarrestar el aumento de la generación de radicales libres.⁴⁰ Este incremento de estrés oxidante puede luego afectar la función de la placenta.^{40,42} En embarazos normales, las defensas antioxidantes de la placenta son consideradas suficientes para controlar la peroxidación de lípidos.⁴⁰ Consecuentemente, el estrés oxidante ha emergido como un probable promotor de varios desordenes relacionados al embarazo, como tal aborto espontáneo, preeclampsia, restricción del crecimiento fetal, parto pretérmino y bajo peso al nacer.⁴²

Se ha estudiado la relación entre el estado oxidativo de la madre y el recién nacido al momento de nacer. Un mayor estrés oxidativo de la madre corresponde a aun mayor estrés oxidativo en la sangre de cordón umbilical del recién nacido.^{41,43}

No está claro, sin embargo, si el estrés oxidativo está relacionado al parto en sí mismo o si esto refleja un estatus oxidativo pre-existente fetal.³⁹ Fetos estresados paridos de emergencia por cesárea exhibieron un incremento en la concentración de MDA, un parámetro indicativo de daño oxidativo, y un aumento de la actividad de GPx en sangre de cordón umbilical comparado a fetos no estresados paridos por cesárea optativa. Esto probablemente indica un mayor estrés oxidativo fetal.³⁹

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ERITROCITO NEONATAL

Los eritrocitos son las primeras células de los recién nacidos para revelar la susceptibilidad del neonato a estrés oxidativo.²⁷ En contraste la esperanza de vida del eritrocito adulto de 120 días, la del eritrocito neonatal es de solo 60 a 90 días, los infantes pretérmino tienen aun más corta su esperanza de vida de 35 a 50 días.^{32,33} Los eritrocitos de infantes recién nacidos difieren de los de adulto en la composición bioquímica y propiedades biofísicas. Las diferencias con respecto al adulto incluye variación en el tamaño del eritrocito, forma, composición de la globina, y metabolismo celular.^{32,33} Una de las características típicas de eritrocitos dañados es la presencia de células densas. Células anormales morfológicamente están incrementadas en las fracciones más densas.^{20,25} En sangre de cordón umbilical hay una población de eritrocitos muy densa y área superficial disminuida. Alrededor de 4 veces más Hb oxidada y 2 veces los niveles de hemicromos enlazados a membrana se encontró en eritrocitos de cordón que en eritrocitos de adultos siendo más evidente en las fracciones densas. La Hb oxidada asociada a membrana (y tal vez al esqueleto de membrana) es un marcador de daño oxidativo mas generalizado, quien podría generar la población de células inusualmente densas encontradas en sangre de cordón umbilical y en última estancia acortar su esperanza de vida.³⁴

Algunas características de los eritrocitos neonatales que los predispone a daño oxidativo se han conocido por varias décadas. Las principales son bajos niveles de vitamina E y actividad disminuida de superóxido dismutasa.²⁹ Amplia variación de enzimas antioxidantes dentro de los eritrocitos puede explicar por qué la investigación sobre la relación entre sus actividades y predisposición a enfermedad por radicales libres ha producido resultados inconsistentes.²⁸ Cuando se observan bajo el microscopio de interferencia, la mitad de los eritrocitos en infantes pretérmino y un cuarto de los eritrocitos de los infantes a término tienen pozos en la superficie, comparado con solo 2.6% en eritrocitos de adulto. Estos pozos en la superficie se cree son una consecuencia de la pobre función esplénica del neonato.³² También se observan vacuolas y estructuras internas justo debajo de la membrana celular.³³

En ausencia de una protección eficiente por factores antioxidantes, estrés oxidativo es responsable de la liberación de hierro en forma reactiva, predisponiendo a los neonatos a riesgo de daño oxidativo severo, debido a la producción y propagación de reacciones por radicales libres.²⁶

El papel del hierro y la formación de radical hidroxilo en la reacción de Fenton y daño al eritrocito fue demostrado en experimentos en los cuales las células fueron incubadas en un medio que contiene una serie de agentes oxidantes. Células tratadas con fenilhidrazina (PHZ) causó mayores cambios morfológicos en eritrocitos de neonatos que en adulto. Un producto de oxidación de Hb que contiene hierro diferente de metHb, se encontró en las células neonatales y no se encontró en las células expuestas de adulto.³⁵

La susceptibilidad de la hemoglobina fetal (HbF) (que comprende 70% a 90% de la hemoglobina en el eritrocito neonatal),²⁶ a oxidación podría deberse a características peculiares de la hemoglobina, que puede generar cantidades mayores de superóxido, peróxido y radicales hidroxilo. Esta propiedad de la HbF puede desestabilizar la molécula y conducir a la formación de productos oxidantes de hemoglobina, así contribuyendo a aumentar la susceptibilidad oxidativa de eritrocitos neonatales.³³

Además la actividad de metahemoglobina reductasa dependiente de NADH es alrededor de 50% menor en células de neonato. Esta baja actividad limita la reducción de metahemoglobina a Hb funcional.³⁵

“Rangos de referencia” son desarrollados cuando es imposible o inapropiado establecer “rangos normales” por extracción de sangre en voluntarios normales sanos.³⁶ Cada semana que avanza en edad gestacional, el hematocrito aumenta 0.64% y la concentración de Hb aumenta 0.21g/dL. No se observaron diferencias con base al género. Durante el intervalo de 4 horas después de nacer, valores hematocrito/hemoglobina de pretérmino tardío y neonatos a término (35-42 semanas de gestación) aumento 3.6% \pm 0.5% (media \pm SD), aquellos neonatos de 29 a 34 semanas de gestación permaneció sin cambio, y aquellos <29 semanas de gestación disminuyó 6.0% \pm 0.3%. Durante los primeros 28 días después de nacer, una disminución en hematocrito/hemoglobina aproximadamente lineal ocurre.³⁶

Hay evidencia indirecta que estrés oxidativo acorta la esperanza de vida de eritrocitos de recién nacidos, pero no hay una demostración clara de una relación entre lesión por ROS e incremento en hemólisis, lo mismo ocurre para la anemia temprana de infantes prematuros, aunque la esperanza de vida de los eritrocitos de estos infantes es más corta y la deficiencia de antioxidantes más frecuente que neonatos a término.²⁸

Estudios de transfusión cruzada demostraron que la esperanza de vida corta es intrínseca de la célula y no es una característica de la circulación fetal.³⁷

Puesto que los grupos sulfhidrilo (-SH) en particular cuentan para la protección de lesiones oxidativas de la célula. Se han realizado estudios en eritrocitos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos a término sanos, y valores secuenciales en sangre de los mismos infantes horas y días después de nacer, para determinar si este importante factor podría estar involucrado en la peculiar susceptibilidad de eritrocitos de infantes a hemólisis oxidativa. Se sugiere que los grupos reactivos sulfhidrilo de eritrocitos están menos involucrados en la detoxificación de agentes oxidantes durante las primeras horas de vida.⁴⁴

Si los eritrocitos muestran baja reactividad de PSH utilizan su repertorio de enzimas antioxidantes.⁴⁵

La determinación química de grupos sulfhidrilos reactivos en eritrocitos y la evaluación de glutatión demostró la ausencia de diferencias entre sangre de cordón umbilical y sangre de infantes de 4 días de edad.⁴⁴ Esto no excluye la posibilidad que otros factores que PSH y enzimas dependientes de glutatión podrían operar en la sangre de cordón umbilical para asegurar una respuesta adecuada antioxidante.⁴⁵

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las primeras mediciones que dan señal del estado de salud de los niños es el peso al nacer, que es resultado de las condiciones socioeconómicas y de salud de las madres.

Un recién nacido de bajo peso al nacer (de 2,500g o menos) es resultado tanto de nacimiento prematuro, retraso del crecimiento fetal (intrauterino) o a ambos factores. El bajo peso al nacer está estrechamente relacionado con morbi-mortalidad neonatal y fetal, inhibiendo el crecimiento y desarrollo cognitivo, y posteriores enfermedades crónicas en la vida.⁴⁶ De los nacidos vivos durante 2010 en México 2,643,908; 219,444 (8.3%) presentaron bajo peso al nacer, siendo el Distrito Federal la entidad con el mayor porcentaje 25,456 (11.6%), seguido por el Estado de México 23,041 (10.5%). Nacidos vivos con bajo peso se refiere a los niños que pesaron entre 800 gramos y 2 499 gramos al nacer.⁵¹

La mortalidad neonatal es el indicador que se usa para expresar el riesgo de fallecer o las expectativas de supervivencia de los recién nacidos durante los primeros 28 días de vida. Este indicador se subdivide en mortalidad neonatal precoz entre uno y seis días, y mortalidad neonatal tardía entre 7 y 28 días. Este parámetro indica las condiciones de embarazo y parto de una población que a su vez ésta relacionada con su estado socioeconómico y con la oportunidad y calidad de atención de los servicios de salud. En México en 2010 la muerte neonatal precoz fue de 12,875 y la mortalidad neonatal tardía 5,588 por lo tanto las muertes neonatales representan 63.96% de la mortalidad de niños menores de 1 año de edad de un total de 28,865. Las principales causas de muerte neonatal son: ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal clave CIE.^{48,49,50}

En el estado de México en 2010 fueron 4,010 muertes en menores de un año, mortalidad neonatal precoz 1,588 y mortalidad neonatal tardía 782 mientras que en el distrito federal 3,119 muertes de menores de un año, muerte neonatal precoz 1,223 y mortalidad neonatal tardía 662.⁵⁰

A nivel mundial se ha estimado que las principales causas de muerte neonatal son: prematuridad (28%), infecciones (26% (incluye tétanos, diarrea)) y asfixia (23%). Las malformaciones congénitas son responsables de 7-8% de la mortalidad neonatal. La mayoría de las muertes neonatales ocurren en la primera semana y la mayor parte de estas en las primeras 24 horas de vida. Después de la primera semana de vida, las enfermedades infecciosas respiratorias, gastrointestinales, y el tétanos neonatal representan la tercera parte de mortalidad neonatal.⁵¹

Conforme los niños crecen, enfrentan problemas de salud que en ocasiones requieren de atención hospitalaria, durante 2009, la principal causa de hospitalización de los niños menores de 1 año son las afecciones originadas en el periodo perinatal (62.8%).⁴⁷

Dado que alrededor de 5-7% de todos los infantes nacen prematuramente y que esta proporción podría incrementarse como una consecuencia del aumento del número de nacimientos múltiples debido a tratamientos de infertilidad, surge la necesidad de determinar la situación del balance oxidantes/antioxidantes en infantes prematuros y su evolución a través de la vida postnatal temprana.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es comparar los niveles de expresión de Trx1 en eritrocitos de sangre de cordón umbilical de infantes a término y pretérmino sanos.

HIPÓTESIS

Dentro del útero el desbalance redox debido a estrés podría disminuir la reserva antioxidante fetal. Por lo tanto, esperamos obtener menores niveles de Trx1 en eritrocitos de neonatos pretérmino en comparación con los de término.

JUSTIFICACIÓN

Los datos son escasos y controversiales sobre los posibles mecanismos de adaptación neonatal a estrés oxidativo fisiológico del parto y vida postnatal temprana. En el caso de prematuridad, la información es aun escasa y muchos de los estudios se han hecho solo en plasma. Varios estudios han examinado las funciones de enzimas antioxidantes (por ejemplo, SOD y catalasa), Vitaminas (C,E), y otras proteínas (por ejemplo; ceruloplasmina, bilirrubina, transferrina) en poblaciones neonatales, sin embargo, no he sido capaz de encontrar estudios que hayan examinado el sistema tiorredoxina en eritrocitos de sangre de cordón.

La determinación del poder antioxidante del eritrocito es importante desde dos puntos de vista: este puede indicar baja protección contra daño tisular debido a especies de oxígeno y es una causa potencial de anemia hemolítica. La relación entre poder antioxidante del eritrocito y enfermedades potenciales son relevantes para la neonatología.

SUJETOS Y MÉTODO

Recolección de la muestra

Mi proyecto formó parte de un proyecto mayor sobre la investigación del estado redox de sangre de cordón umbilical. Mi interés se centró en la Trx1. Yo obtuve las muestras de sangre de cordón umbilical ya separadas en plasma y lisados de eritrocitos y almacenadas a -70 C. Sin embargo, a continuación resumo la obtención de estas muestras en el hospital. Se ingresó a la unidad de Tococirugia Área de quirófanos, destinados para uso exclusivo de pacientes Obstétricos (Cesáreas, legrados, etc.) cuenta con comunicación directa con cuneros y terapia intensiva neonatal, facilitando la atención inmediata del bebé. Para seleccionar a los pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, es decir, que eran candidatos para realizar el estudio, se informó a la madre en qué consistía el trabajo, que es lo que involucraba el estudio y si estaba de acuerdo, firmó una carta de consentimiento informado. Posterior a esto se tomó la muestra de sangre de vena de cordón umbilical inmediatamente después del parto para ser procesada en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto Nacional de Perinatología en donde se separó el plasma y las células, cada uno de estas fracciones fue guardado en el congelador de menos setenta grados Celsius hasta que se juntó el tamaño de la muestra.

Los eritrocitos se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min y se removió el sobrenadante, se lavaron tres veces con PBS pH 7.4, al botón de eritrocitos se le añadió 4 veces su volumen de agua desionizada fría, se agitaron y se dejó reposar 10 min en hielo. El lisado de eritrocitos se almaceno a -70°C.

Criterios de inclusión

Neonatos con las siguientes características:

- Edad gestacional al nacimiento de 25 a 40 semanas
- Con traslado directo de las UCIN y UCIREN

Criterios de exclusión

Neonatos con las siguientes características:

- Malformaciones congénitas mayores
- Con enfermedades que afecten el patrón de crecimiento como síndrome colestásico, errores innatos del metabolismo, síndrome de Down, síndrome de Turner y cardiopatías.
- Infección congénita activa por toxoplasma, rubéola, citomegalovirus y herpes 1 y 2.
- Isoinmunización materno fetal (ABO o Rho)
- Asfixia perinatal

Las muestras de sangre de vena umbilical heparinizada se obtuvieron de 27 recién nacidos. De estos, 12 infantes nacieron a término y 15 nacieron pretérmino. Todos nacieron por cesárea.

Determinación de Trx1

Se realizaron alícuotas de un mililitro de cada muestra de lisado de eritrocitos de cordón, proseguimos a eliminar las membranas de los lisados por lo que centrifugamos a 18000 x g por 30 min. Posteriormente transferimos el sobrenadante a tubos eppendorf, para eliminar la hemoglobina las muestras fueron desproteinizadas por el método modificado de Tsuchihashi como sigue: Una alícuota de 0.480mL de etanol-cloroformo (2:1) fue adicionado (El solvente se almaceno a -30°C para utilizarlo frio),⁵³ se homogeneizó vigorosamente en agitador de tubos aprox. 30s, luego las proteínas fueron sedimentadas por centrifugación 2000 x g por 10min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf y el solvente alcohol-cloroformo fue removido por evaporación a 70°C por 1h 45 min.⁵⁴ A las muestras que presentaron grumos se les añadió 20µL de NaOH 1N se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente.⁵⁵

Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras problema por la técnica colorimétrica de reactivo de Bradford, cuantificando en el espectrofotómetro a 595 nm y extrapolando de una curva patrón utilizando como patrón primario albumina humana en concentración de 1mg/mL de agua.

Separación de proteínas

Utilizando la técnica de (SDS-PAGE) para la separación de proteínas se elaboraron geles de 1.5mm de espesor que consiste de un gel concentrador al 5% y un gel separador al 15% de poliacrilamida respectivamente. Cada muestra de proteína se diluyó con amortiguador Laemmli / 1,4-Ditiotreitol (DTT) (10:1), se mantuvieron a 100°C por 5 minutos. El marcador de peso molecular (7µL) y proteínas (2µg) de cada muestra se aplicó en el gel. Las proteínas fueron separadas por la aplicación de 28 mA por 1 hora utilizando Tris-glicina-dodecil sulfato de sodio de amortiguador de corrida. Posteriormente las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V por 1 hora usando Tris-glicina-etanol de amortiguador de corrida la cámara de transferencia.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución al 5% de albumina por 30 min a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente se le añadió el anticuerpo primario Anti-Trx 1:1000 (Cell Signaling Technology) en solución de albumina al 5%, se

dejó incubando toda la noche a 4°C en agitación. Se recuperó el anticuerpo primario para posterior uso, y se prosiguió a hacer 5 lavados de 5 min con TBST cada uno, después se le añadió el anticuerpo secundario IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa de rabano 1:40000 en solución de leche sin grasa por una hora a temperatura ambiente y agitación. Se le hicieron 5 lavados con TBST por 5 min (al tercer lavado se volteo la membrana y se continuo con los lavados). A la membrana se le añadió la mezcla de reactivos de un kit de Quimioluminiscencia por 1 min a temperatura ambiente, luego colocamos la membrana entre acetatos y lo colocamos dentro de un cassette para posteriormente revelar en películas quimioluminiscentes Kodak expuestas a diferentes tiempos 3, 5, 10 min y toda la noche. Las densidades de expresión de la Trx1 se determinó por análisis densitométrico.

Análisis estadístico

Los datos de Trx1 obtenidos del densitómetro (Biorad) se presentan como Media \pm Error Estándar de la Media (SEM), utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Características básicas de los sujetos de estudio se presentan con media \pm desviación estándar. Diferencias entre los valores de intensidad de señal reportados como Unidades Arbitrarias (AU) se analizaron para la significancia estadística mediante una prueba de Wilcoxon con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

La muestra de sangre fue obtenida de 27 neonatos con edad gestacional de 34.9 ± 3.8 (media \pm desviación estándar) semanas, que van de 25 a 40 semanas y peso al nacer de 2318.3 ± 793.2 g (934 - 4195 g). Su índice Apgar (a los 5 minutos) fue 8.8 ± 0.4 (8-9). De estos, 12 infantes nacieron a término con edad gestacional 38.4 ± 0.8 (37-40) semanas, peso al nacer 3072.6 ± 430.5 g (2585 – 4195 g) y Apgar 8.9 ± 0.2 (8-9) y 15 nacieron pretérmino con edad gestacional 32.1 ± 2.6 (25-36) semanas, peso al nacer 1715.3 ± 382.7 g (934 – 2494 g) y Apgar 8.8 ± 0.4 (8-9) (Tabla 1).

	Pre-término (n=15)	Término (n=12)
Edad gestacional	32.1 ± 2.6	38.4 ± 0.8
Peso al nacer	1715.3 ± 382.7	3072 ± 430.5
Apgar	8.8 ± 0.4	8.9 ± 0.2

TABLA I. Características básicas de los sujetos de estudio. Niveles de expresión de Trx1 (unidades arbitrarias), Edad gestacional (semanas), Peso al nacer (gramos) de los 27 recién nacidos. Los datos se presentan con media \pm desviación estándar.

Las proteínas características de los eritrocitos, tanto en la fracción soluble y en membrana, son altamente abundantes. Esto incluye banda 3 (un millón de copias por célula, 30% de las proteínas de membrana), espectrina (100,000 copias por célula, 75% del citoesqueleto) y hemoglobina (97% masa seca de la proteína soluble del eritrocito y 35% de la masa total). La revelación de proteínas poco abundantes es complicada por la presencia de estos componentes celulares muy altamente expresados. La hemoglobina presenta un desafío adicional: debido a su naturaleza anfipático esta se acumula en la membrana del eritrocito durante la lisis comprometiendo así la detección de proteínas poco abundantes no sólo en la fracción soluble.⁵²

Para hacer frente a este problema hicimos cambios en la metodología para poder aumentar la sensibilidad del ensayo y así poder detectar proteínas poco abundantes en comparación con la espectrina y hemoglobina.

A partir de esta nueva metodología, se analizaron entonces las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y Western blot, utilizando un anticuerpo

específico para la Trx1 y revelando mediante quimioluminescencia. Se cuantificó la intensidad óptica relativa (ROI de sus cifras en inglés, relative optic density) de la única banda que detectó el anticuerpo anti-Trx1 en todas las muestras, y que correspondió al peso molecular esperado de la Trx1 (12 kDa).

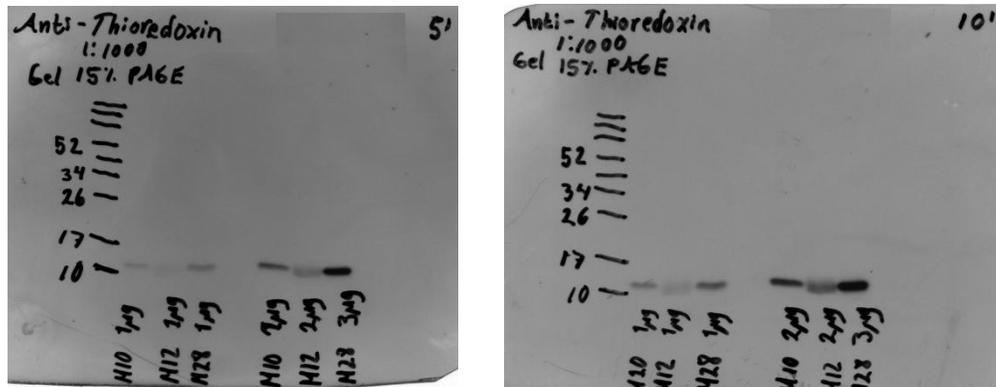


Fig. 3. Demostración de la sensibilidad y linealidad del sistema Western blot utilizado relacionado a la proteína total de la extracción Etanol/Cloroformo. Las diferentes muestras de proteínas se separaron por SDS/PAGE al 15% bajo condiciones reductoras incrementando la cantidad en μg . Trx1 de 12kDa puede ser detectada a $1\mu\text{g}$ con anti-Trx1 monoclonal como se describió en la sección de métodos. Se determino que una concentración de $2\mu\text{g}$ y un tiempo de exposición de 10min son las mejores condiciones para determinar Trx1.

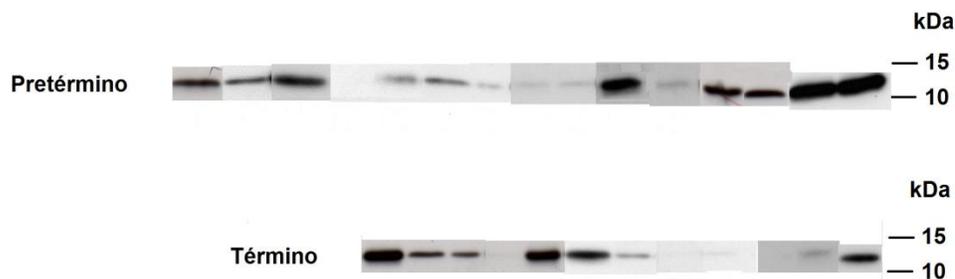


Fig. 4. Análisis inmunoblot de la expresión de Trx1 en eritrocitos de sangre de cordón umbilical de recién nacidos pretérmino y a término relacionado a la proteína total de la extracción Etanol/Cloroformo. La Hb fue precipitada de los lisados como se describió, y las proteínas celulares $2\mu\text{g}$ fueron analizados por SDS/PAGE al 15% bajo condiciones reductoras.

Los niveles de expresión de Trx1 fueron mayores en recién nacidos pretérmino (164.52 ± 102.04) en comparación con los neonatos a término (130.80 ± 118.0). Como se puede observar en la Figura 1, los valores fueron muy dispersos para ambas poblaciones de estudio sin embargo, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

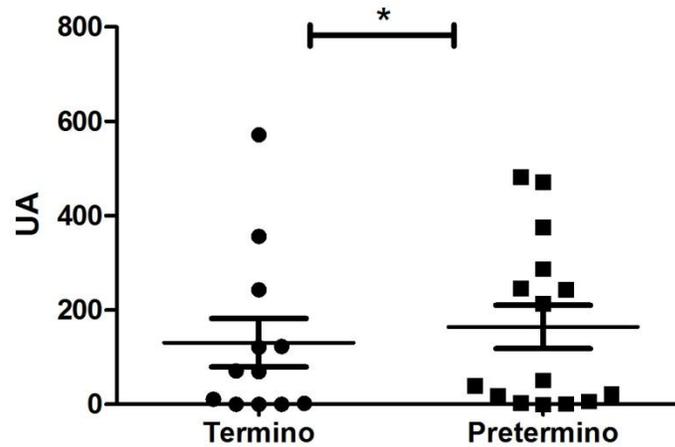


Figura 1. Niveles de expresión de Trx1 en neonatos a término y pretérmino. Proteínas aisladas de eritrocitos fueron analizadas mediante electroforesis de proteínas y western blot con un anticuerpo anti-Trx1 y revelado mediante quimioluminiscencia. UA, Unidades arbitrarias de intensidad de señal. Los datos son la Media \pm Error Estándar de la Media (SEM). $p = 0.05$.

DISCUSIÓN

Las respuestas fisiológicas neonatales normales al proceso de nacer son complejas. En particular, un recién nacido debe adaptarse a cambios bruscos en la concentración de oxígeno y al incremento de la generación de ERO después de la entrada a un ambiente normóxico poco tiempo después de nacer. Los infantes prematuros, en particular, tienen un alto riesgo de morbilidad debido a su incrementado estrés oxidativo.

Trx1 es una pequeña proteína universal multifuncional con actividad redox disulfuro/ditioil y juega un papel citoprotector contra estrés oxidativo de varios tipos.^{5,9,11,13}

El presente estudio comparo los niveles de expresión de Trx1 en eritrocitos de sangre de cordón umbilical de infantes recién nacidos a término y pretérmino utilizando un método inmunológico de unión antígeno-anticuerpo para poder detectar a la Trx1 mediante un anticuerpo anti-Trx1. Se halló que los niveles de expresión de Trx1 son significativamente mayores en infantes recién nacidos pretérmino. Los orígenes de este incremento en eritrocitos de cordón umbilical se desconocen.

Una acelerada eliminación de eritrocitos del torrente sanguíneo ocurre en recién nacidos a término y pretérmino. Varias teorías han sido propuestas para explicar la acortada esperanza de vida de eritrocitos neonatales, las cuales sugieren una aceleración del proceso de envejecimiento normal. La repentina elevación de la presión parcial de oxígeno después del parto podría causar daño oxidativo a las células por radicales libres. Factores involucrados en la regulación del estatus redox y estructura de la membrana podrían modular el riesgo de anemia.

La elevación de la expresión de Trx1 podría ser beneficioso por efectos antioxidantes directos e indirectos de Trx1 así como suplementar de equivalentes reductores a Prx's. Tal vez más importantemente, Trx1 asegura el mantenimiento de esenciales grupos tiol reducidos para la actividad de numerosas enzimas que son inactivadas por estrés oxidativo, como tal la enzima glicolítica gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.^{5,11,13} Utilizando ratones transgénicos TRX se mostró que hTrx1 protege células, tejidos y órganos contra estrés oxidativo, siendo benéfico en la primera parte de la vida pero no en la longevidad máxima.^{56,57}

Diferencias entre grupos pueden ser probadas como estadísticamente significativas con muestras pequeñas,⁵⁸ como en nuestro estudio. Sin embargo, para una mayor seguridad en estudios posteriores se deberá de incrementar el tamaño de muestra ya que observamos una gran variabilidad dentro de cada grupo de estudio.

Una fuente posible de gran variación en los niveles de Trx1 son algunos parámetros que no fueron controlados al tomar las muestras (las muestras fueron recolectadas para otro trabajo de investigación) como son: estatus socioeconómico, talla y edad de la madre, madres primerizas, un solo bebé, rango de la edad gestacional. El control de estas características sería ideal en un futuro para que ambas muestras fueran rigurosamente

homogéneas, de entrada, en todo aquello que, de alguna forma, pudiera influir en el estudio que se realiza⁵⁸ o que nos permitiera poder estratificar los datos en función de estos parámetros.

Otras fuentes potenciales de variabilidad dentro de los datos merecen una discusión (ver limitaciones metodológicas).

Aunque la expresión de Trx1 ha sido detectada en otros tejidos en la vida fetal humana temprana (9-23 semanas) poco se conoce sobre su expresión durante el último tercio de gestación o el periodo perinatal.

Trx1 está ampliamente distribuida en diferentes órganos y tejidos durante el periodo fetal. También se encontró ampliamente pero selectivamente distribuido en diferentes órganos y tejidos durante la vida adulta. Sin embargo la intensidad de tinción de estos tejidos fue más débil que en el periodo fetal. La diferencia en la intensidad de tinción entre las células de adulto y feto probablemente corresponde no sólo a la actividad celular pero también al grado de diferenciación de las células.⁶²

Los neonatos más prematuros tendrán una masa disminuida de eritrocitos al nacer y un mayor volumen corpuscular medio comparado con neonatos a término. El número de eritrocitos nucleados es también mayor y persiste por más tiempo comparado con neonatos a término.⁶³

Condiciones estresantes causa el traslado de Trx1 del citoplasma al núcleo.^{9,11,64}

Una serie de genes, cuyos productos juegan un importante papel en defensa de organismos contra estrés oxidativo o xenobióticos, contienen una región promotora un elemento de respuesta antioxidante (ARE por sus siglas en ingles). Vale la pena sobresaltar que transcripción del gen TRX1, en turno, es regulado vía ARE. Una hipótesis sería que tal mecanismo de auto-intensificación efectuado por Trx1 permite acelerar la respuesta celular a efectos oxidativos y mantener el balance redox.^{9,11} Hemin (la forma oxidada del hemo) induce la expresión de Trx1.^{9,65}

Bajo condiciones de estrés oxidativo excesivo, daño a la membrana de eritrocitos puede resultar debido a la actividad disminuida de enzimas enlazadas a membrana, la inhibición de sistemas transportadores transmembrana, y a la fuga de constituyentes celulares dentro del plasma.⁶⁶

Como ocurre con nuestro trabajo, la amplia dispersión de los niveles de expresión de Trx1 con respecto a los valores medios también fueron encontrados en los valores de GSSG, en lisados de eritrocitos de cordón de recién nacidos a término y pretérmino, que puede estar relacionado a diferentes factores perinatales que inducen estrés fetal intrauterino y parto pretérmino.⁶⁷ GSSG es transportado fuera de los eritrocitos estresados oxidativamente por dos sistemas dependientes de la concentración de ATP y GSSG.⁶⁸ En infantes pretérmino hay un incremento de glutatión en plasma al nacer. Infantes pretérmino quienes desarrollan síndrome de estrés respiratorio RDS tienen menor concentración de glutatión en eritrocitos en las primeras horas de vida.⁶⁹

La concentración de Trx1 demostró significativamente una correlación inversa con la edad gestacional y peso al nacer. En un estudio previo en el cual se midió la concentración de Trx1 en suero de sangre de cordón umbilical, se encontró que las concentraciones de Trx1 fueron de seis a siete veces mayores que en sangre de adultos sanos. En los recién nacidos pre-término fueron significativamente mayores que aquellos de recién nacidos a término, también mostró que la concentración de Trx1 en suero tiende a ser mayor cuando los recién nacidos son mas prematuros y con menos peso. Los orígenes de este incremento en sangre de cordón umbilical no se han clarificado.⁷⁰

Trx1 es sintetizada en grandes cantidades en el hígado, y también en otros tejidos. Sin embargo, es muy difícil obtener muestras de tejidos de infantes pretérmino para determinación de su estatus Trx1. Los eritrocitos están más rápidamente disponibles, y tienen altas concentraciones de Trx1. Por lo tanto, sus niveles representan mejor la situación en células y tejidos que los niveles de Trx1 en plasma.^{5,62,70}

Los eritrocitos pueden también proteger otros tejidos, como tal los pulmones, contra lesiones oxidativas por suplementarlos con antioxidantes intracelulares y por lo tanto aumentando su capacidad antioxidante.⁶⁹

Señalar que Trx1 exógena puede penetrar dentro de las células, disminuyendo la producción de ERO y dificultando la aparición de apoptosis.⁹

Trx1 en su forma oxidada sale de la célula a través de la membrana plasmática. Secreción de Trx1 no sigue la ruta clásica RE-Golgi. Los índices de los niveles de Trx1 en suero o plasma sanguíneo puede utilizarse para el diagnóstico de varias enfermedades.¹³

Mas allá de la sobre-regulación o disminuida-regulación de expresión de Trx1 a nivel de genes, la actividad de Trx1 es regulada por modificación post-translacional.^{9,11,13,19}

Debido a que los efectos biológicos de Trx1 son mediados predominantemente por su forma reducida, Trx1 contienen cinco residuos cisteína, estas cisteínas pueden estar presentes en diferentes estados de oxidación, incluyendo Trx1 dimerizada vía oxidación de Cys73.^{9,11,13,19}

Se ha reportado bajo condiciones oxidantes que, aunque se incremente el nivel de expresión de Trx1 su actividad disminuye.^{71,72}

Muestras de pulmones (de babuinos paridos por histerotomía sacrificados en el parto antes de la primera respiración) obtenidas in vivo no muestran formación del dímero, pero sí muestran una comparable distribución de Trx1 reducida y oxidada.⁶¹

Trx1 parece ejercer la mayor parte de sus propiedades antioxidantes dentro de las células a través de peroxirredoxinas (Prxs), quienes utilizan grupos tiol como equivalentes reductores para destruir oxidantes.^{9,11,20}

Trx's y Prx's comparten rasgos químicos. En sus sitios activos, una cisteína esta en la forma tiolato, quien puede potencialmente reaccionar con H_2O_2 .⁷

No obstante la reacción no-enzimática de Trx1 con H_2O_2 podría ser también lenta para tener en cuenta la oxidación de Trx1 bajo condiciones fisiológicas. Se demostró que Prx's profundamente aumenta la velocidad de reacción entre Trx1 y H_2O_2 , es posible que toda $Trx(S)_2$ puede ser formado a través de la catálisis por las isoformas Prx's específicas de Trx1.⁷

Se ha estudiado la relación entre el estado oxidativo de la madre y el recién nacido al momento de nacer. Donde un mayor estrés oxidativo de la madre corresponde a un mayor nivel de estrés oxidativo del bebé en sangre de cordón umbilical.⁴³

La sangre de vena de cordón umbilical es un reflejo de la relación compleja madre-placenta, por ello se utilizó para asegurar que los valores representan razonablemente los efectos del ambiente intrauterino.⁴¹

Las concentraciones de peróxidos ($< 10\mu M H_2O_2$) fueron muy bajas en suero de sangre de cordón umbilical entre recién nacidos a término pequeños para su edad gestacional y recién nacidos a término apropiados para su edad gestacional (SGA y AGA por sus siglas en inglés, respectivamente) sin significancia entre ellos. Además, ambos grupos tienen significativamente menores cantidades en arteria y vena umbilical que sus madres en el parto. Sus niveles se mantuvieron sobre el tercer día de vida.⁴¹

Opuesto a niños quienes tienen cantidades detectables despreciables de peróxidos en suero de sangre de cordón umbilical tanto vena y arteria, las madres tienen muy incrementado las concentraciones de peróxidos tanto en el parto y tres días después en comparación a mujeres no embarazadas ($< 200 \mu M H_2O_2$). Las madres SGA tienen mayores niveles de peróxidos que madres AGA tanto en el parto y sobre el tercer día después del parto ($> 600\mu M H_2O_2$ y $< 700 \mu M H_2O_2$, $> 500 \mu M H_2O_2$ y $< 400 \mu M H_2O_2$) respectivamente.⁴¹

Los eritrocitos protegen otros tejidos por ingresar y metabolizar peróxidos.^{20,26}

Prx2 con una concentración de $\pm 240\mu M$ ($\pm 100\mu M$ en sangre) es una de las proteínas más abundantes dentro de los eritrocitos. Prx2 por lo tanto se espera ser capaz de remover H_2O_2 rápidamente si su nivel en sangre se incrementa hasta $\pm 100\mu M$. Sin embargo, su eliminación sería atribuible únicamente a destrucción no catalítica, dado que todas las moléculas Prx2 se acumularán como el dímero vinculado a disulfuro del ciclo catalítico como un resultado de la capacidad limitada del sistema Trx en eritrocitos. Bajo estas circunstancias, la eliminación de H_2O_2 adicional dependerá sobre la acción de Catalasa. Además, eritrocitos que carecen de catalasa son altamente sensibles a H_2O_2 exógeno, sugiriendo que catalasa es esencial para la protección contra altos niveles de H_2O_2 .²⁰

Se ha sugerido que GPx1 juega un papel menor en la eliminación de H_2O_2 de los eritrocitos, dado que ratones que carecen de GPx1 parecen normales, y eritrocitos derivados de estos ratones mostraron una defensa virtualmente normal contra H_2O_2 exógeno siempre y cuando la función de catalasa este intacta. Los sustratos fisiológicos primarios de GPx1 se han propuesto por ser peróxidos orgánicos.²⁰

Catalasa, como una dismutasa, no requiere equivalentes reductores para eliminar H_2O_2 , mientras GPx1 y Prx2 requieren los sistemas GSH y Trx, respectivamente, ambos de los cuales derivan equivalentes reductores de NADPH. GSH reductasa, TrxR1, y G6PDH,

quienes son críticos para la producción de GSH, Trx1 reducida, y NADPH, respectivamente, son todos sensibles a inactivación por H_2O_2 . GPx1 y Prx2 se esperan ser cada vez menos eficientes cuando eritrocitos son expuestos a altos niveles de estrés oxidativo por largos periodos debido a que el reciclaje de GSH y Trx se convierten en la velocidad limitante.²⁰

La función consumidora de energía de Prx2 es necesaria además de catalasa independiente de energía para la homeostasis del eritrocito.²⁰

La forma inactiva GPx1-DHA se acumula en eritrocitos viejos aun bajo condiciones normales de flujo de H_2O_2 originado de auto-oxidación de Hb. La forma inactiva sulfinica de Prx2, no se acumula bajo estas condiciones. La cantidad de Prx2 sulfinica se incrementa transitoriamente cuando el flujo de H_2O_2 se incrementa temporalmente por encima de los niveles basales, pero estos pueden ser removidos lentamente por la acción de sulfirredoxina (Srx). Sin embargo, cuando se exponen a un flujo incrementado de H_2O_2 por largos periodos, la forma inactiva tanto de Prx2 y GPx1 se acumulan. Bajo estas circunstancias, catalasa se convierte en el principal jugador, y las concentraciones de H_2O_2 intracelular y peróxidos orgánicos se espera que aumenten.²⁰

Hb es la proteína más abundante dentro de los eritrocitos. Mantenimiento de la estabilidad de Hb es crucial para la fisiología normal. La patofisiología de anemia hemolítica oxidativa esta estrechamente asociada con la estabilidad de la Hb.⁷³

Prx2 en eritrocitos esta estrechamente asociado con el complejo hemoglobina, particularmente con el hemo. Toda la Prx2 esta fuertemente enlazada a Hb, protegiendo y restaurando hemoglobina a su forma activa.⁷⁴

La protección de Hb de estrés oxidativo por Prx2 esta estrechamente asociado con su estatus interactivo.⁷³

La interacción de HbF con oxígeno puede generar mayor cantidad de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, e hidróxidos de lo que lo hace HbA.³⁵

Ratones carentes de Prx2 fueron sanos y fértiles pero desarrollaron anemia hemolítica y esplenomegalia. Interesantemente, el tejido/célula más afectado por la carencia de Prx2 fue el eritrocito quien exhibió una significativa esperanza de vida corta que eritrocitos de tipo salvaje. Cuerpos de Heinz fueron detectados en su sangre periférica, y células morfológicamente anormales fueron elevadas en las fracciones densas de los eritrocitos, los cuales contienen marcadamente altos niveles de ERO. Deficiencia de Prx2 causa oxidación de cisteínas de muchas proteínas en la membrana de eritrocitos, lo cual podría inducir la desnaturalización de moléculas intracelulares y subsecuente destrucción de eritrocitos. Ratones deficientes en catalasa o GPx1 no mostraron signos de oxidación de Hb o hemolisis.⁶⁶

Los bebés recién nacidos a término tienen una relativa policitemia, que provee soporte adicional para sus defensas, menores niveles de HbF, y hay un efecto sinérgico entre el plasma y los eritrocitos. Los neonatos más prematuros tienen una masa disminuida de eritrocitos al nacer y mayores niveles de HbF.^{63,75}

Los dímeros banda 3 son formados bajo condiciones en la cual la liberación de hierro y formación de MetHb son mucho mas elevados. En eritrocitos, IgG autóloga esta enlazada a dímeros banda 3 en mucho mayor porcentaje en recién nacidos pretérmino 74%, que en recién nacidos a término 21% y 10% en adultos sanos. Esto sugiere que la eliminación de eritrocitos es endógena en los recién nacidos. Por lo tanto, al nacer una gran parte de los eritrocitos es rápidamente eliminada por el sistema fagocítico y esto refleja una acelerada eliminación de eritrocitos.²⁴

El análisis genómico sugiere que los fetos se preparan para su inminente transición con niveles altamente expresados de varias enzimas antioxidantes y vías asociadas, probablemente ocurriendo en las últimas semanas de gestación.⁷⁶

SOD1, CAT, GPx1 son fuertemente expresados en sangre de cordón umbilical a término. Lo que sugiere que neonatos a término sanos requieren altos niveles de estas enzimas para asegurar una transición normal. Genes asociados a vías tioredoxina, como tal Prx2 y Prx6, están presentes y altamente expresadas en sangre de cordón umbilical lo que sugiere que esta es otra vía que el neonato a término utiliza para mantener el balance redox.⁷⁶

Limitaciones metodológicas

Una proporción significativa de la Trx1 en el lisado podría estar conjugada a otras proteínas. El lisado debió ser incubado bajo condiciones reductoras antes del tratamiento para la eliminación de Hb con el fin de reducir cualquier mezcla disulfuro conjugado de Trx1 con otras proteínas, por lo que una posibilidad es que hayamos perdido una parte de la Trx1 total.⁵⁹

El hecho de haber encontrado agregados de proteínas en los lisados de la madre y del neonato nos sugiere que sufrieron un mayor estrés oxidativo que pudo provocar agregados en las células. Nuestra técnica desnaturizante para eliminar hemoglobina nos denuncia que otras proteínas pudieron ser también desnaturizadas, estas proteínas se vuelven insolubles en la fase acuosa y solubles en la fase orgánica, al evaporizar la fase orgánica nos garantiza que esas otras proteínas desnaturizadas quedaron en nuestra muestra.^{54,60}

Sin duda la mayor deficiencia es la dispersión tan alta de los bebés pretérmino tanto en su peso como su edad gestacional. La homogeneidad de las madres (edad, estatus socioeconómico) tampoco se consideró.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados podrían suscitar la especulación de que recién nacidos pretérmino nacen con más abundante Trx1 que recién nacidos a término. Altos niveles de Trx1 en estos neonatos pueden proveer un mecanismo protector único que permite el mantenimiento del balance redox durante la transición fetal a neonatal.

Sin embargo, las características de sangre periférica de cordón umbilical de recién nacidos pretérmino comparten muchas características con la sangre periférica de ratones carentes de Prx2.

Análisis del estado redox tanto de Trx1 y Prx's dentro de eritrocitos neonatales así como la interacción de Prx2 con HbF debe ser posteriormente investigada.

Los datos de literatura apoyan aun más la hipótesis de que hay factores relacionados al eritrocito los cuales modulan el riesgo de anemia hemolítica y que estos factores aparentemente involucran la regulación del estatus redox y su estructura de membrana.

Es muy importante evaluar el estatus de estrés oxidativo de la madre con el fin de detectar severo estrés oxidativo en el feto durante el embarazo. Diversas condiciones en los recién nacidos dan lugar a radicales libres: hipoxia, hiperoxia, infección, acidosis, deben por lo tanto ser cuidadosamente evitados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell Barry, Gutteridge John M. C. , **Free Radicals In Biology And Medicine** Oxford University Press Ed 2007;4:12-32
2. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**, Kenneth B. Storey Ed 2004;1:319-338 ISBN 0-471-41090-X
3. Di Simplicio P., Franconi F., Frosalí S., and Di Giuseppe D., **Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells** Amino Acids 2003;25: 323–339
4. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ.; **Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise** Arch Biochem Biophys 2009;490:77–84
5. Gromer S, Urig S, Becker K.; **The Thioredoxin System_From Science to Clinic**, Med Res Rev 24 (2004) pp 40-89
6. Mitchell Douglas A., Morton Sarah U., Fernhoff Nathaniel B., Marletta Michael A.; **Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells** Proc Natl Acad USA 2007 104, 11609–11614
7. Forman Henry Jay, Fukuto Jon M., and Torres Martine; **Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers** Am J Physiol Cell Physiol 2004;287: C246–C256
8. Gitler Carlos, Zarmi Batia, Kalef Edna, Meller Ruth, Zor Uriel, and Goldman Rachel; **Calcium-Dependent Oxidation of Thioredoxin during Cellular Growth Initiation** Biochem Biophys Res Commun 2002;290;624–628
9. Kalinina E. V., Chernov N. N., and Saprin A. N., **Involvement of Thio-, Peroxi-, and Glutaredoxins in Cellular Redox-Dependent Processes**, Biochemistry (Moscow), 2008;73:1493-1510
10. Spector Abraham, Yan Guo-Zai, Huang Ruey-Ruey C., McDermott Martin J., Gascoyne Peter R.C., and Pigiet Vincent; **The Effect of H2O2 upon Thioredoxin-enriched Lens Epithelial Cells** J Biol Chem 1988;263: 4984-4990
11. Powis Garth and Montfort R. William; **Properties and biological activities of thioredoxins** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001;41:261–95
12. Kondo Norihiko, Nakamura Hajime, Masutani Hiroshi, and Yodoi Junji, **Redox Regulation of human Thioredoxin Network** Antioxidants & Redox Signaling 2006;8:1881-1887
13. Arnér S. J. Elias and Holmgren Arne, **Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase**, Eur. J. Biochem. 2000;267:6102-6109
14. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A.; **Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding**, Biochim Biophys Acta 2008;1783;641–650
15. Holmgren A, Jun Lu ; **Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease** Biochem Biophys Res Commun 2010;396:120–124
16. Watson Walter H., Yan Xianmei, Choi Young Eun, Jones Dean P., and Kehrer James P.; **Thioredoxin and Its Role in Toxicology** Toxicological Sciences 2004;78:3–14

17. Powis Garth, Mustacich Debbie, and Coonthe Amy; **Role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer** Free Radical Biology & Medicine 2000;29:312–322
18. Mitchell Douglas A. *et al*; **Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells** PNAS 2007 104, 11609–11614
19. Kumuda C. Das and Chandan K. Das; **Thioredoxin, a Singlet Oxygen Quencher and Hydroxyl Radical Scavenger: Redox Independent Functions** Biochemical and Biophysical Research Communications 2000;277:443–447
20. Chun-Seok Cho, Sukmook Lee, Geun Taek Lee, Hyun Ae Woo, Eui-Ju Choi, and Sue Goo Rhee; **Irreversible Inactivation of Glutathione Peroxidase 1 and Reversible Inactivation of Peroxiredoxin II por H₂O₂ in Red Blood Cells,** Antioxidants & Redox Signaling 2010; 12:1235-1246
21. Houssay B. Alberto- Ciangoli E. Horacio y colaboradores, **Fisiología humana de Houssay**, Editorial El Ateneo, 7° edición, 2000, pp107-125
22. Foller Michael, Huber Stephan M. and Lang Florian; **Erythrocyte Programmed Cell Death**; IUBMB Life 2008;60: 661-668
23. Antonelou Marianna H., Kriebardis Anastasios G., and Papassideri; **Aging and death signaling in mature red cells: from basic science to transfusion practice**, Blood Transfus 2010;8:39-47
24. Rossi Viviana, Leoncini Silvia, Signorini Cinzia, Buonocore Giuseppe, Paffetti Patrizia, Tanganelli Donatella, Ciccoli Lucia, and Comporti Mario; **Oxidative stress and autologous immunoglobulin G binding to band 3 dimers in newborn erythrocytes** Free Radical Biology & Medicine 2006;40:907–915
25. Clemens Michael R. and Waller Hans; **Lipid Peroxidation in Erythrocytes** Chemistry and Physics of Lipids, 1987;45:251-268
26. Burak Cimen M. Y., **Free radical metabolism in human erythrocytes**, Clinica Chimica Acta 390 (2008) 1-11
27. Buonocore G. and Perrone S.; **Biomarkers of oxidative stress in the fetus and Newborn** haematologica reports 2006; 2:103-107
28. Bracci R, Perrone S and Buonocore G, **Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period**, Acta Paediatr Suppl 2002;438:130-134.
29. Ochoa Julio J., Contreras-Chova Francisco, Muñoz Sergio, Araujo-Nepomuceno Eduardo, Bonillo Antonio, Molina-Carballo Antonio, and Muños-Hoyos Antonio; **Fluidity and oxidative stress in erythrocytes from very low birth weight infants during their first 7 days of life** Free Radical Research, September 2007; 41: 1035-1040
30. Richards R.S., Roberts T.K., Mcgregor N.R, Dunstan R.H., and Butt H.L.;**The role of erythrocytes in the inactivation of free radicals** *Medical Hypotheses* (1998) 50, 363-367
31. Grattagliano Ignazio Russmann Stefan, Palmieri Vincenzo O., Portincasa Piero, Palasciano Giuseppe, and Lauterburg Bernhard H.; **Glutathione peroxidase, thioredoxin, and membrane protein changes in erythrocytes predict ribavirin-induced anemia** Clin Pharmacol Ther 2005;78:422-32.
32. Steiner A. Laurie, and Gallagher G. Patrick, **Erythrocyte Disorders in the Perinatal Period**, Semin Perinatol 2007;31:254-261

33. Bracci Rodolfo and Buonocore Giuseppe, **The antioxidant status of erythrocytes in preterm and term infants**, *Semin Neonatol* 1998;3:191-197
34. Advani R., Mentzer W, Andrews D, Schirier S.; **Oxidation of Hemoglobin F Is associated with the Aging Process of Neonatal Red Blood Cells**, *Pediatric Research* 1992;32:165-168
35. Shahal Yael, Bauminger Erika R., Zmora Ehud, Katz Miriam, Mazor Dalia, Horn Sarah, and Meyerstein Naomi; **Oxidative Stress in Newborn Erythrocytes** *Pediatr Res* 1991;29:119-122
36. Jopling Jeffery, Henry Erick, Wiedmeier Susan E., and Christensen Robert D.; **Reference Ranges for Hematocrit and Blood Hemoglobin Concentration During the Neonatal Period: Data From a Multihospital Health Care System** *Pediatrics* 2009;123:e333-e337
37. Kondo Masatoshi, Itoh Susumu, Kusaka Takashi, Imai tadashi, Isobe Kenichi, Onishi Shoju; **The ability of neonatal and maternal erythrocytes to produce reactive oxygen species in response to oxidative stress** *Early Human Development* 2002;66:81– 88
38. Robles R., Palomino N., and Robles A.; **Oxidative stress in the neonate** *Early Human Development* 2001;65:S75–S8
39. Gitto Eloisa, Pellegrino Salvatore, Gitto Placido, Barberi Ignazio and Reiter Russel J.; **Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin**, *J. Pineal Res* 46 (2009) 128-139
40. Myatt Leslie and Cui Xiaolan; **Oxidative stress in the placenta** *Histochem Cell Biol* (2004) 122: 369-382
41. Snjezana Gveric-Ahmetasevic, Sunjic Borovic Suzana, Skala Hana, Andrisic Luka, Stroser Marina, Zarkovic Kamelija, et al; **Oxidative stress in small-for-gestacional age (SGA) term newborns and their mothers** *Free Radical Research*, April 2009; 43: 376-384
42. Kais H. Al-Gubory, Fowler Paul A., and Garrel Catherine; **The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010;42:1634–1650
43. Arguelles Sandro, Machado Maria José, Ayala Antonio, Machado Alberto, and Hervías Blas; **Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth** *Free Radical Research*, June 2006; 40: 565–570
44. Bracci Rodolfo, Martini Giacomo, Buonocore Guiuseppe, Talluri Beatrice, Berni Silvia, Ottaviani Maria Francesca, Picchi Maria Pia, and Casini Adriana; **Changes in Erythrocyte Properties during the First Hours of Life: Electron Spin Resonance of Reacting Sulfhydryl Groups** *Pediatric Research* 1988;24:391-395
45. Di Simplicio Paolo, Cacace Marcello G., Lusini Lorenzo, Giannerini Fabiola, Giustarini Daniela, and Rossi Ranieri; **Role of Protein -SH Groups in Redox Homeostasis— The Erythrocyte as a Model System** *archives of biochemistry and biophysics* 1998;355:145–152
46. MacDonal G. Mhairi, Mullett D. Martha, Seshia M. K. Mary **Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn**, 6^{ta} Edition 2005 Lippincott Williams ε Wilkins pag. 490
47. **Estadísticas a propósito del día del niño por René Dávila 2012**
<http://journalmex.wordpress.com/2012/04/27/estadisticas-a-proposito-del-dia-del-nino/>

48. Clasificación Internacional de Enfermedades CIE 10° REVISION
<http://www.ms.gba.gov.ar/EstadodeSalud/cie10/cie10.pdf>
49. Principales causas de mortalidad infantil (menores de un año), 2008.
<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
50. Conjunto de datos: Mortalidad general; consulta de: defunciones infantiles; Según: Edad menores de de 1 año
http://www.inegi.org.mx/lib/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?proy=mort_mg
51. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. v.62 n.5 México sep./oct. 2005
versión impresa ISSN 1665-1146
52. Pasini E.M., Mann M., A.W Thomas, **Red blood cell proteomics**, *Transfusion Clinique et Biologique* 2010;17:151–164
53. Tsuboi K K., Estrada J., and Perry B. Hudson, **Enzymes of the human erythrocyte** 1957. 19-29.
54. Rivetz B, Lipkind MA, Shichmanter E, Bogin E., **A method for the determination of free neuraminic acid split from red blood cell receptors by attached newcastle disease virus during simultaneous elution and hemolysis**, *Experientia* 36 (1980) 370-371.
55. Lowry H. Oliver, Rosebrough J. Nira, Farr Lewis A., and Randall J. Rose, **Protein measurement with the folin phenol reagent**, May 28 1951, 265-275.
56. Pérez VI, Cortez LA, Lew CM, Rodriguez M, Webb CR, Van Remmen H, Chauduri A, Qi W, Lee S, Bokow A, Fok W, Jones D, Richardson A, Yodoi J, Zhang Y, Tominaga K, Hubbard GB, Ikeno Y.; **Thioredoxin 1 overexpression extends mainly the earlier part of life span in mice**, *J Gerontol A biol Sci Med Sci* 2011;66:1286-99
57. Tkagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J.; **Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 4131±4136, March 1999
58. Carrasco de la Peña José L; **El metodo estadístico en la investigación Médica**, editorial ciencia 3, S.A., Biblioteca Central, RA407C36 1984
59. Jackson Richard J., Campbell Elizabeth A., Herbert Pamela, and Hunt Tim; **The Preparation and Properties of Gel-Filtered Rabbit-Reticulocyte Lysate Protein-Synthesis Systems** *Eur. J. Biochem.* 1983;131: 289-301
60. **Manhas Sheila K.; Levels of CuZnSOD in erythrocytes of alzheimer's disease patients and normative aging subjects**, Thesis Master of science in the school of kinesiology, 1994
61. Kumuda C. Das, Guo Xiao-Ling, and Whithe Carl W.; **Induction of thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in lungs of newborn primates by oxygen**, *Am. J. Physiol.* 1999;276:530-539
62. Fujii S, Nanbu Y, Konishi I, Mori T, Masutani H, Yodoi J **Immunohistochemical localization of adult T-cell leukaemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, in human fetal tissues.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991 419:317–326
63. Proytcheva Maria A.; **Issues in Neonatal Cellular Analysis** *Am J Clin Pathol* 2009;131:560-573
64. Hirota Kiichi, Nakamura Hajime, Masutani Hiroshi, and Yodoi Junji; **Thioredoxin Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002;957:189–199

65. Young-Chul Kim, Masutani Hiroshi, Yamaguchi Yoshimi, Itoh Ken, Yamamoto Masayuki, and Yodoi Junji et al.; **Hemin-induced Activation of the Thioredoxin Gene by Nrf2** the journal of biological chemistry 2001;276:18399–18406
66. Tae-Hoon Lee, Sun-Uk Kim, Seong-Lan Yu, Seu Hee Kim, Do Sim Park, Hyung-Bae Moon et al; **Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice**, Blood 2003;101:5033-5038
67. Frosali Simona, Di Simplicio Paolo, Perrone Serafina, Di Giuseppe Daniela, Longini Mariangela, Tanganelli Donatella, Buonocore Giuseppe; **Glutathione Recycling and Antioxidant Enzyme Activities in Erythrocytes of Term and Preterm Newborns at Birth**, Biol Neonate (2004) 85: 188-194
68. Kondo Takahito, Dale George L., and Beutler Ernest; **Thiol Transport from Human Red Blood Cells**, Methods in Enzymology 1995;252:72-82
69. Ahola T., Levonen A. L., Fellman V., Lapatto R.; **Thiol metabolism in preterm infants during the first week of life** Scand J Clin Lab Invest 2004; 64: 649 – 658
70. Todoroki Yukiko, Hirokazu Tsukahara, Yusei Ohshima, Ken-Ichi Shukunami et al; **Concentration of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk**, Free Radical Research, 39: 291-297 2005
71. Yuexing Yuan, Jiao Xiangying, Bond Lau Wayne, Wang Yajing, Cristopher Theodore A., Lopez Bernard L., RamachandraRao Satish P.; **Thioredoxin Glycation: A Novel Post-Translational Modification that Inhibits Its Anti-Oxidant and Organ Protective Actions** Free Radic Biol Med. 2010 August 1; 49(3): 332–338.
72. Weihua Shan Zhong Weixiong, Zhao Rui, and Oberley Terry D.; **Thioredoxin 1 as a subcellular biomarker of redox imbalance in human prostate cancer progression** Free Radic Biol Med. 2010; 49: 2078–2087.
73. Han YH, Kim SU, Know TH, Lee DS, Ha HL, Park DS, Woo EJ, Lee SH, Kim JM, Chae HB, Lee SY, Kim BY, Yoon do Y, Rhee SG, Fibach E, Yu DY.; **Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability** Biochem Biophys Res Commun 2012;426:427–432
74. Stuhlmeier Karl M., Kao Janet J., Wallbrandt Pia, Lindberg Maria, Hammarstrom Barbro, Broell Hans, and Paiged Beverly; **Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates** Eur. J. Biochem. 2003;270:334–341
75. Silberstein Tali, Mankuta David, Shames Alexander I., Linkhtenshtein Gertz I., Meyerstein Dan, Meyerstein Naomi, and Saphier Oshra; **Neonatal blood is more resistant to oxidative stress induced by stable nitroxide radicals than adult blood**, Arch Gynecol Obstet 2008;277:233-237
76. MaronJill L., Johnson Kirby L., Parkin Christopher, Iyer Lakshamanan, Davis Jonathan M., Bianchi Diana W.; **Cord blood genomic analysis highlights the role of redox balance**, Free Radical Biology &Medicine 2010;49:992-996