



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Carrera de Licenciatura en Biología*

## *“Tesis de Diploma”*

*Parámetros bioquímicos de estrés oxidativo en pacientes con*  
*Insuficiencia Renal Crónica en estadios*  
*de prediálisis y hemodiálisis.*

*Autor: Arturo Matos Ruiz.*

*Tutores: MSc. Danay Heredia Ruiz*

*MSc. Douglas Fernández Caraballo.*

*Santa Clara*

*2013.*





*“Nuestro mayor orgullo no ha de ser el no haber fracasado nunca, sino en cambio, el habernos puesto de pie cada vez que hayamos caído.”*

*Confucio.*

*Esta tesis se la dedico a mi Madre, por estar siempre a mi lado  
y a todas aquellas personas que me ayudaron durante  
mi trayectoria universitaria.*

*Agradezco:*

*A la Revolución cubana por haberme brindado la oportunidad de transitar por sus aulas universitarias y por ser quien soy.*

*A todas las personas que trabajaron de una u otra forma conmigo en el desarrollo de esta tesis, en especial a mis tutores Danay y Douglas por su entrega teórica, guía y apoyo.*

*También quisiera agradecer a todos y cada una de las personas que me ayudaron a llegar al final de esta etapa particularmente: mi papá Pablo, mis abuelos Eladio e Ignacia, a mi hermano Lázaro Miguel, a mi novia Jessica y a mi padrino José.*

*A mis compañeros de aula Rosario, Maireby, Keylin, Emma, Beatriz, Denyer, Daykeni, Aciel y Daylon que me tendieron la mano cuando lo llegué a necesitar a lo largo de la carrera.*

*A mis amigos (a) incondicionales Claudia, Riskel, Yaisel y Yoniel por su desvelo para que pudiéramos estar aquí.*

*Y por sobre todas las personas, a mi madre Milagros, que sin ella nada de esto hubiera sido posible, gracias por tu preocupación, disposición, paciencia y guía.*

*A todos gracias*

*Arturo.*

**Resumen.**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbi-mortalidad de los pacientes con enfermedad renal crónica. Los llamados factores de riesgo tradicionales no son capaces de explicar la alta incidencia de estos sucesos, por lo que en la actualidad se buscan nuevos factores de riesgo; entre éstos el estrés oxidativo aumentado podría ser un contribuyente importante del riesgo cardiovascular en estos pacientes. El objetivo de este trabajo fue estudiar indicadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedad renal (47 en estadio de pre-diálisis y 54 bajo tratamiento de hemodiálisis) y compararlos con un grupo control para determinar la existencia de un estado redox alterado. Fueron determinadas, en 174 muestras de suero, la actividad de las enzimas Superóxido dismutasa y Catalasa, así como las concentraciones de Glutación reducido y Malonildialdehído. En todos los casos se utilizaron métodos espectrofotométricos y los resultados se compararon usando el paquete estadístico SPSS. Se evidenció en los pacientes de pre-diálisis una disminución en la actividad de la Superóxido dismutasa (30,77%) y en los niveles de Glutación (18,09%); así como un aumento de Malonildialdehído (121,99%). Los pacientes en hemodiálisis mostraron una disminución de la actividad de ambas enzimas antioxidantes Superóxido (40,00%) y Catalasa (19,97%), así como la concentración de Glutación reducido (18,44%); mientras que aumentó el Malonildialdehído (344,33%). Se constató que a medida que progresa el daño renal, se alcanza un estado redox más alterado debido a una disminución del sistema enzimático antioxidante y al daño a macromoléculas como los lípidos.

Palabras claves: enfermedad renal crónica, estrés oxidativo, Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación, malonildialdehído.

**Abstract.**

Cardiovascular diseases are the major cause of morbi-mortality in patients with chronic renal disease nowadays. Considering that traditional risk factors are not capable to explain this situation new risks factors are searched to understand the high incidence of cardiovascular events in this group of patients. Among them an increased oxidative stress could be an important cardiovascular risk in these patients. The aim of this work was to study oxidative stress indicators in patients with renal disease (47 in pre dialysis and 54 under haemodialysis treatment) and compare them with a control group in order to determine the presence of an altered redox state. It was determined enzymatic activity superoxide dismutase and catalase besides levels of reduced glutathione and malonildialdehyde in serum samples. It was used spectrophotometric methods in all cases and the results were compared using a statistical software SPSS. Patients in pre dialysis state showed a significant reduction of superoxide dismutase activity (30,77%) and reduced glutathione (18,09%) with a significant increase of Malonildialdehyde (121,99%). By the other hand haemodialysed patients had reductions in superoxide dismutase (40,00%) and catalase (19,97%) activity and reduced glutathione (18,44%) along with a significant increase of malonildialdehído (344,33%). As conclusion we can say that a progressive renal damage is related with an altered redox state as consequence of a reduced antioxidant enzymatic system that lead to oxidative damage to lipids.

Key words: chronic renal disease, oxidative stress, Superoxide dismutase, Catalase, Gluthatione, Malonildialdehído.

## Índice.

<b>Introducción</b>	1
<b>Objetivos</b>	3
<b>Capítulo 1: Revisión Bibliográfica</b>	4
1.1 Generalidades del Estrés Oxidativo	4
1.2 Sistemas antioxidantes	7
1.3 Formas de medir el daño oxidativo	9
1.4 SOD	12
1.4.1 SOD extracelular	13
1.5 CAT	13
1.5.1 Función enzimática	14
1.5.2 Importancia biomédica	15
1.6 Glutación	16
1.7 MDA	18
1.8 Estrés oxidativo en pacientes con IRC	18
1.9 Alteraciones renales asociadas	20
1.9.1 Alteraciones glomerulares	20
1.9.2 Alteraciones túbulo-intersticiales	21
1.9.3 Disfunción endotelial	21
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b>	23
2.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados	25
2.1.1 Determinación de la actividad SOD	25
2.1.2 Determinación de la actividad CAT	26
2.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH	27
2.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA	28
<b>Capítulo 3: Resultados</b>	29
3.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados	29
3.1.1 Determinación de la actividad SOD	29
3.1.2 Determinación de la actividad CAT	29
3.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH	30
3.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA	31
<b>Capítulo 4: Discusión</b>	33



4.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados .....	33
4.1.1 Determinación de la actividad SOD .....	33
4.1.2 Determinación de la actividad CAT .....	35
4.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH .....	37
4.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA .....	38
<b>Conclusiones</b> .....	<b>40</b>
<b>Recomendaciones</b> .....	<b>41</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>42</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>53</b>

## **Introducción.**

Los estudios sobre estrés oxidativo (EO) se encuentran entre las principales investigaciones en el campo de las ciencias médicas, debido a su amplia aplicación en la reducción del daño causado por los radicales libres (RL). Estos RL se producen a partir del oxígeno molecular, comenzando por el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y su conversión en potentes oxidante, tales como el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ) (Hicks *et al.*, 2006; Valco *et al.*, 2007). Cuando la generación de radicales libres del oxígeno sobrepasa las numerosas barreras de defensas antioxidantes del organismo, se produce un aumento del daño a las estructuras biológicas por lesiones químicas. A este proceso se le denomina EO y el mismo se define como un desbalance de las defensas antioxidantes con respecto a la producción incrementada de especies reactivas, las cuales intervienen en múltiples situaciones fisiopatológicas (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Durante la última década se ha dedicado un considerable esfuerzo a investigar el papel de los RL en la patogenia de las enfermedades. En el caso del riñón, el EO representa un punto de convergencia del mecanismo de daño renal provocado por nefropatías resultantes de muy diversas etiologías (González *et al.*, 2006).

Cada vez existe mayor evidencia de la presencia de esta condición de estrés en los pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) y particularmente los sometidos a tratamiento de hemodiálisis. Esto parece ser debido a múltiples factores que incluyen un aumento de la producción de sustancias reactivas del oxígeno generadas por los leucocitos activados, metales de transición y otras toxinas de diferente peso molecular (Couchoud *et al.*, 2007).

En la actualidad se consideran a las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de morbi-mortalidad en los pacientes con IRC en estadio terminal. Estos pacientes presentan de tres a cinco veces más posibilidades de padecer un evento cardiovascular que la población en general (Jungers *et al.*, 2006) y de 15 a 50 veces los pacientes en diálisis (Prichard, 2006).

Estudiando los factores de riesgo cardiovascular en estos pacientes se ha observado que junto a los factores tradicionales, los mismos presentan factores intrínsecamente ligados

al estado de EO el cual es considerado como un contribuyente importante en el riesgo cardiovascular (Luke, 2005).

La prevalencia de la IRC en Cuba se comporta dentro de los rangos internacionales. Por cada millón de habitantes existen de 3 500 a 4 000 personas afectadas por esta entidad y de ellos unos 100 por cada mil habitantes cada año tienen necesidad de ingreso en diálisis y trasplante renal. Hasta la actualidad se encuentran en tratamiento de diálisis aproximadamente 2 200 casos y se han trasplantado 800 en todo el país. En la provincia de Villa Clara la incidencia de IRC es de aproximadamente 80 casos anuales, por lo que es importante subrayar que esta enfermedad tiene un comportamiento epidémico en crecimiento.

Por lo antes mencionado, sería de gran utilidad para la práctica clínica de rutina contar con una batería de biomarcadores que permitan caracterizar el ambiente redox sistémico en pacientes que padecen de enfermedades asociadas a la IRC. Estas determinaciones bioquímicas permitirán individualizar la terapia de cada paciente y contribuir a reducir los daños oxidativos que tienen lugar durante el desarrollo y progreso de la enfermedad. Adicionalmente, el presente trabajo constituye una prueba fehaciente de la aplicabilidad y utilidad clínica de estos biomarcadores y de su contribución a un diagnóstico más eficaz e integral.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, nos propusimos los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

- Determinar parámetros bioquímicos de estrés oxidativo en pacientes con Insuficiencia Renal Crónica en estadios de prediálisis y hemodiálisis.

**Objetivos Específicos:**

- Cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa y Catalasa en pacientes de prediálisis, hemodiálisis y un grupo control.
- Cuantificar las concentraciones séricas de Glutación reducido y Malonildialdehído en los tres grupos.

## **Capítulo 1. Antecedentes.**

### **1.1 Generalidades del Estrés Oxidativo**

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos aerobios. Este elemento desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, y constituye lo que se conoce como el "soporte de la vida"; pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como estrés oxidativo (EO) (John *et al.*, 2007).

En 1954, la investigadora argentina Rebeca Gerschman definió el EO como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y sugirió por primera vez que los radicales libres (RL) eran agentes tóxicos, generadores de patologías que podían iniciar dicho desbalance oxidativo relacionándose así con la génesis de diversas afecciones (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Sin embargo, no fue hasta el año 1969 cuando se comprobó implícitamente la generación de estos elementos como subproductos de las reacciones biológicas en las células. En ese año McCord y Fridovich descubren la existencia en humanos de la Superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la conversión del anión superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La existencia de la enzima implicaba la presencia del radical  $O_2^-$  como elemento formado durante el metabolismo oxidativo celular. Desde entonces se ha verificado la formación de diversos elementos reactivos derivados del oxígeno durante el metabolismo oxidativo y su participación en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Hicks *et al.*, 2006).

Los RL son átomos o grupos de átomos con una configuración electrónica de capas abiertas, por lo que llevan al menos un electrón desapareado en el orbital externo que les confiere una alta inestabilidad y reactividad química (Valco *et al.*, 2007; Dalle-Donne *et al.*, 2006), que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no), iniciando mecanismos de reacciones en cascada que dan lugar a un estado que se puede dividir en tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

Solo cuando coinciden dos RL pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así con dichas reacciones.

Estos RL se pueden formar por tres vías principalmente: 1) ruptura del enlace covalente de una molécula, reteniendo cada fragmento un electrón del par compartido; 2) pérdida de un electrón; y 3) adición de un electrón. Salvo en circunstancias inusuales tales como altas temperaturas, radiaciones ionizantes y luz ultravioleta, estos se generan en las células fundamentalmente por reacciones con transferencia de electrones (Gutiérrez-Salinas, 2007).

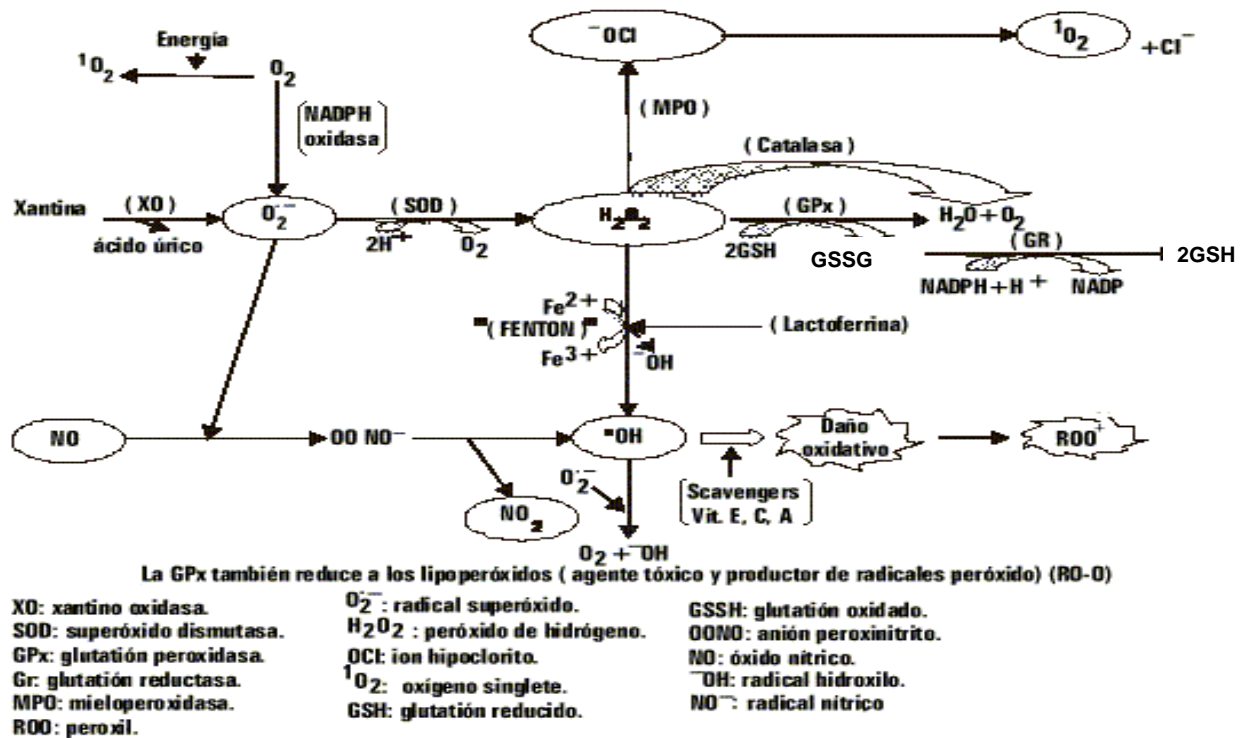
El  $O_2^-$  se origina en las mitocondrias y en membranas celulares. En la mitocondria el oxígeno molecular es metabolizado en la cadena respiratoria por la vía tetravalente, pero una pequeña proporción (2-5%) se escapa por una vía univalente, donde el oxígeno capta un electrón y se convierte en este radical (Dalle-Donne *et al.*, 2006), que suele generar la existencia de otros radicales denominados especies reactivas del oxígeno (EROs).

Desde el punto de vista químico el  $O_2^-$  es un buen agente reductor, pero tan solo un moderado agente oxidante. Desde el punto de vista biológico, existen numerosas evidencias de la citotoxicidad de este elemento en múltiples circunstancias (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Existen ejemplos de compuestos de baja reactividad química (ej. Cloruro potásico, cianuro sódico o la toxina del veneno de cobra) que producen reacciones letales cuando son inyectados en un animal. Por tanto, la citotoxicidad no siempre es sinónimo de reactividad orgánica. La toxicidad del  $O_2^-$  es el resultado de su ataque directo o indirecto a nivel molecular y la acción de radicales generados secundariamente (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

A partir del  $O_2^-$  se forman el resto de las EROs, destacando el  $H_2O_2$ , oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), hipoclorito (OCl), cloraminas y el hidroxilo (OH) (Hicks *et al.*, 2006).

También existen otras especies reactivas como el peroxil y el alcoxil, resultantes de la acción del  $\cdot OH$  y que constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica, el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el óxido nítrico (ON) y el proxinitrito ( $OONO\cdot$ ).



Fuente: <http://scielo.sld.cu/img/revistas/mil/v29n3/f0107300.gif>

Figura 1. Representación metabólica de las especies reactiva del oxígeno y del nitrógeno.

Los RL también poseen efectos beneficiosos, principalmente cuando son producidos por componentes del sistema inmunológico, considerándoseles de esta forma protectores (defensa frente a infecciones, respiración mitocondrial, inflamación, síntesis de prostaglandinas, etc.), aunque por otro lado se le atribuyen numerosas acciones deletéreas (envejecimiento, cáncer, enfermedades cardiovasculares, pulmonares y catarata entre otras) al ser altamente reactivos y capaces de reaccionar con una gran variedad de macromoléculas biológicamente importantes como ADN, lípidos y proteínas (Dean, 2006).

La corta vida de las especies reactivas es consecuencia del ataque al elemento próximo, aunque parecen mostrar especial avidez por los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes de las membranas biológicas. El resultado de esta última reacción es una peroxidación lipídica en cadena, capaz de desestructurar y alterar las funciones de membranas tanto lisosomales, mitocondriales, endoplasmáticas o celulares, modificando

su permeabilidad y conduciendo eventualmente a la lisis y muerte celular (Ferretti *et al.*, 2008).

## **1.2 Sistemas antioxidantes**

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan EROs. Esta situación hace que las células posean una alta concentración de productos oxidados del metabolismo (Hicks *et al.*, 2006), lo que es incompatible con la vida, a menos que existan en el organismo mecanismos de defensa que las neutralicen. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un RL (Crimi *et al.*, 2006). El antioxidante, al colisionar con un RL le cede un electrón, oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico, ejemplo de este mecanismo lo constituye la vitamina E. No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas estas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos, que a su vez reaccionan con los RL (Maria Luisa *et al.*, 2006).

Para evitar que se desborde el insulto oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener estas defensas de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión.

Los RL son inestables de manera inherente y habitualmente desaparecen de forma espontánea, no obstante con el paso a la vida oxigenada las células se dotaron de sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos, como por ejemplo las enzimas SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) las cuales tienen la función de prevenir la oxidación de los sustratos sobre los que actúan (Hicks *et al.*, 2006) y no enzimáticos como las vitaminas E y A, el ácido ascórbico, el glutatión reducido (GSH) y oligoelementos como hierro, cobre, cinc, manganeso y selenio (Gutiérrez-Salinas, 2007). Además existen otros compuestos con residuos tioles reducidos, albúmina, ácido úrico, bilirrubina, así como los estrógenos y melatonina, recientemente incorporados a esta lista (Jordan y Gibbins, 2006).

Como se ha podido apreciar estos mecanismos homeostáticos son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas.



Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y scavengers o barredores de radicales (Ramos *et al.*, 2008).

Enzimas:

- La citocromo oxidasa: encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.
- La SOD: especializada en captar el radical  $O_2^{\cdot-}$  mediante una dismutación y así convertirlo en  $H_2O_2$ .
- CAT, GPx y glutatión reductasa (GRd): neutralizan al  $H_2O_2$  y lo convierten en agua.

Scavengers o barredores:

- La vitamina E o alfa tocoferol neutraliza al radical  $\cdot OH$  por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante.
- La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el  $O_2^{\cdot-}$  y con el  $\cdot OH$ , también es captor del  $^1O_2$  y del OCL.
- El GSH, además de captar el  $H_2O_2$  como sustrato de la GPx, también capta al  $^1O_2$  y al  $\cdot OH$ .
- La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RL.

Este sistema defensivo, que lo mismo puede estar en el citosol que en las membranas, no es totalmente efectivo, por lo que hay involucrada una segunda línea constituida por:

- Sistemas reparadores de biomoléculas encargados de reparar el daño producido al ADN que pudieran propiciar trastornos genéticos o cancerígenos.
- Sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroproteinasas y las endonucleasas (John *et al.*, 2007).

Se conocen tres tipos principales de antioxidantes (Jurek *et al.*, 2006):

1. PRIMARIOS: Previenen la formación de nuevos RL, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de RL a partir de otras moléculas como lo hacen las enzimas SOD, GPx, CAT, GRd, Glutatión S transferasa y proteínas que se unen a metales como la ferritina, transferrina y

ceruloplasmina, limitando así la disponibilidad de hierro necesaria para la formación del radical  $\cdot\text{OH}$ .

2. SECUNDARIOS: Capturan los RL, evitando la reacción en cadena (Ej.: vitamina E o alfa-tocoferol, vitamina C o ácido ascórbico, vitamina A o beta-caroteno, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, ubiquinol-10, metionina)

3. TERCIARIOS: Reparar las biomoléculas dañadas por los RL (Ej.: enzimas reparadoras de ADN y metionina sulfóxido reductasa) (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

El desbalance en la producción de EROs y la defensa antioxidante originan el EO el cual trae consigo una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan el deterioro y muerte celular (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Crimi *et al.*, 2006).

### **1.3 Formas de medir el daño oxidativo**

El daño oxidativo se puede medir de forma directa o indirecta (Beamer y Holian, 2005):

#### Métodos directos

##### Medición de la concentración de agentes oxidantes.

Durante los últimos años se ha tratado de medir la concentración de agentes oxidantes en el organismo, pero ha resultado difícil en muchos casos, por tener estos un tiempo de vida media muy corto. El radical  $\cdot\text{OH}$  tiene una vida de  $1 \times 10^{-10}$ . La espectrometría de resonancia de rotación (espín) de electrones es la única técnica analítica que mide directamente las EROs, pero su aplicación en el ser humano no es factible aún, además de ser muy caro el equipamiento necesario (Martin *et al.*, 2006).

Recientemente ha sido desarrollado un equipo fotométrico con reactivos incluidos para determinar los niveles de RL en sangre. La prueba está basada en el hecho de que los metales de transición, una vez liberados de su forma quelante, forma en que generalmente se encuentran en el plasma y dentro de las células, tienen la capacidad de catalizar reacciones del tipo redox. Los productos de estas reacciones son atrapados por derivados fenólicos, que resultan en la formación de una solución coloreada que puede ser medida espectrofotométricamente (Regano *et al.*, 2008).

### Métodos indirectos

#### 1. Determinación de productos terminales de la acción oxidante.

Se han desarrollado métodos para medir algunas de las EROs, pero indirectamente, mediante los productos terminales de su acción oxidante sobre proteínas, ADN y lípidos.

Las EROs inducen en las proteínas la acumulación de grupos carbonilos (Bulbul y Deb, 2007; Paul *et al.*, 2008), que pueden ser determinados después de la condensación con 2-4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH), comúnmente utilizada para evaluar la oxidación de proteínas celulares. Este método es muy laborioso, largo y utiliza gran cantidad de solventes, por lo que recientemente se ha desarrollado un nuevo método ELISA para medir este compuesto.

Con respecto al ADN existen más de 12 metabolitos producidos durante el ataque radicalico a esta molécula, pero solo algunos han podido ser utilizados como marcadores de dicho ataque, entre estos se encuentran el glicol de timidina y el 8-OH-2 deoxiguanosina (Rivera *et al.*, 2006).

En el caso de los lípidos tiene lugar la lipoperoxidación, considerada como un proceso complejo en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la substracción de hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente (Pamplona, 2008). No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los RL en algún tipo de daño celular, y existen varias formas de medirla:

- Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico basado en la reacción de este ácido con el malonildialdehído (MDA) originado del desdoblamiento de los hidro-peróxidos. Esta reacción rinde un compuesto coloreado el cual puede ser medido directamente. Este análisis es usado por su sencillez y su factibilidad práctica.
- Medición de otros aldehídos procedentes también de la lipoperoxidación como el 4 hidroxinonenal, susceptible de ser medido por HPLC con detección ultravioleta.
- Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado principalmente etano y pentano, respectivamente derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos

insaturados de las series omega-3 y omega-6. No es un método invasivo, pero por lo complicado resulta muy molesto a los pacientes.

- Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación como la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos, pero solo es útil para etapas tardías de la peroxidación.

Toda esta serie de indicadores que miden los productos del daño oxidativo a proteínas, ADN y lípidos, en el mejor de los casos proveen datos semicuantitativos acerca de su presencia en algunos fluidos orgánicos (Kemp *et al.*, 2008).

## 2. Medición de la concentración de antioxidantes.

Los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar por diferentes enfermedades, por lo que al monitorearlos pueden ser utilizados como marcadores de enfermedades y para el seguimiento terapéutico.

Se han desarrollado productos diagnósticos que conceden, según sus autores (Regano *et al.*, 2008), una exacta y rápida medición del rango de parámetros antioxidantes.

Dentro de esta amplia gama, los más comercializados son los que miden antioxidantes de tipo enzimáticos: SOD y CAT (den Hertog *et al.*, 2005).

Algunas casas comerciales también producen juegos de reactivos para determinar antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C, A y E, y la ubiquinona.

Además se pueden medir antioxidantes de segunda línea, como son las enzimas reparadoras del daño al ADN, nombradas redoxiendonucleasas (Terada, 2006).

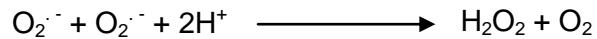
## 3. Medición del estado antioxidante total.

El estado antioxidante total refleja el balance dinámico entre el sistema antioxidante y los prooxidantes y es utilizado como instrumento para estimar el riesgo de daño oxidativo. La medición del estado antioxidante es beneficiosa en un sinnúmero de enfermedades.

De la misma manera que son medidas innumerables sustancias relacionadas con el daño oxidativo, son múltiples los métodos empleados en tal medición y van desde la simple espectrofotometría, pasando por el HPLC, hasta llegar a la moderna quimioluminiscencia (John *et al.*, 2007).

#### 1.4 Superóxido dismutasa

Descubierta por McCord y Fridovich en 1969, esta enzima cataliza la reacción de dos aniones  $O_2^{\cdot -}$  para formar  $H_2O_2$ , es decir:



Las SODs forman un conjunto de enzimas que están presentes en casi todas las células. Solo los organismos anaerobios y escasas bacterias aerobias carecen de SOD, ya que su función fisiológica consiste en la eliminación de los radicales  $O_2^{\cdot -}$  producidos en las reacciones del metabolismo aerobio (Mc Cord *et al.*, 1974).

Se conocen 3 formas de SODs según el metal que utilizan como cofactor. Estas a su vez pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes: CuZn-SODs y Mn-SODs (Asaba *et al.*, 2007).

Como las concentraciones del  $O_2^{\cdot -}$  son normalmente bajas, la reacción depende de su difusión. Sin embargo, la asociación de la enzima con su sustrato no es una simple cuestión de difusión y colisión. La estructura submolecular de la enzima, la distribución de carga electrostática, y las interacciones hidrodinámicas, pueden afectar tanto la difusión del radical  $O_2^{\cdot -}$  como su asociación con la proteína. Se ha encontrado que el campo eléctrico de la SOD favorece 30 veces la velocidad de asociación del anión (Kliment *et al.*, 2008).

En los eucariotas existen tres tipos de SODs de diferente localización: Mn-SOD mitocondrial, CuZn-SOD citosólica y CuZn-SOD extracelular.

El gen que codifica este enzima se encuentra ubicado en el cromosoma 21 y específicamente en el segmento extra (21q22) que aparece en el síndrome de Down, de ahí que los niveles de SOD se encuentren elevados en la generalidad de estos casos (Gongora *et al.*, 2008).

La SOD ha sido purificada de diversas fuentes tales como hongos, guisante verde, germen de trigo, mutantes de *Streptococcus*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* (Sergei y James, 2006).

#### **1.4.1 SOD extracelular**

Esta enzima es encontrada en el espacio intersticial de los tejidos y también en los fluidos extracelulares, contando con la mayor actividad SOD del plasma, linfa y fluido sinovial (Lu y Daret, 2009). Es secretada como un tetrámero que contiene átomos de cobre y cinc unidos a glicoproteínas con gran afinidad por ciertos glicosaminoglicanos, tales como el heparín y heparan sulfatos. Es por ello que esta SOD puede existir unida a la vasculatura, principalmente en la superficie de las células endoteliales (Kliment *et al.*, 2008). Debido a esta localización la SOD extracelular se ha señalado como el principal regulador de la biodisponibilidad del ON derivado del endotelio (Schwchenberg, 2006; Mc Intyre *et al.*, 2006). Su regulación en mamíferos ocurre de manera coordinada mediante citoquinas más que una respuesta celular individual a agentes oxidantes (Folz, 2007).

#### **1.1 Catalasa**

En 1819, fue descrita por Thenard la descomposición del  $H_2O_2$  por el tejido animal (Louis-Jacques, 1819), y con posterioridad, Schonbein demostró que el gas liberado producto de esta reacción era el oxígeno; pero fue O. Loew quien nombró por primera vez a la enzima CAT, cuya actividad catalítica permite la rápida conversión del  $H_2O_2$  en oxígeno y agua (Makya *et al.*, 2009).

La CAT fue obtenida en forma cristalina a partir de hígado bovino por Sumner y Dounce en 1937, constituyendo uno de los primeros éxitos en la cristalización de una enzima intracelular (Sumner y Dounce, 1937); obteniéndose con posterioridad de sangre y de otras fuentes, presentando todas semejanzas en el peso molecular, número de subunidades y tipos de grupos prostéticos.

La CAT (peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en los eritrocitos, hígado y riñones. Su actividad varía en dependencia del tejido, siendo más elevada en hígado y riñones, y más baja en el tejido conectivo. En las células se localiza en las mitocondrias y en la matriz de los peroxisomas, pudiendo estar unida a las membranas, mientras que en los eritrocitos se encuentra en estado soluble (Okuno *et al.*, 2010; Peter *et al.*, 2007). Esta metaloproteína tetramérica cuyo peso molecular oscila en el rango de 210 000 – 280 000 Dalton consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX siendo

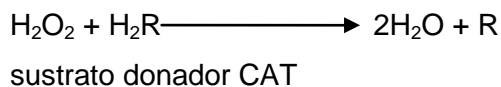
su peso molecular aproximado de 59 000 Dalton. El contenido protohémico y el contenido de hierro representan un 1.1 % y 0.09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima (Madhur y Anjan, 2010; Nicholls *et al.*, 2006).

En algunas especies la CAT contiene moléculas de NADPH ligadas estrechamente a la enzima. Se ha demostrado que la CAT humana y de res está ligada a cuatro subunidades de NADPH con una constante de disociación menor que  $1 \cdot 10^{-8}$  M (Putnam *et al.*, 2008).

El NADPH puede intervenir en la prevención y reversión parcial de la inactivación de la CAT por su propio sustrato tóxico. Este cofactor es uno de los donadores endógenos involucrados en la recuperación de la actividad y estabilidad de la enzima por tener un efecto alostérico sobre su configuración (Putnam *et al.*, 2008). Por otra parte investigadores han notificado efectos restauradores y protectores del NADPH y NADH sobre la CAT purificada expuesta a análogos de la vitamina K (Marcelo *et al.*, 2007). Esta enzima es considerada como una proteína reguladora, permitiendo que el mecanismo de la GRd opere más eficientemente cuando la célula está bajo condiciones de EO (Henry y Gian, 2007).

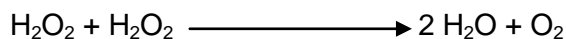
### 1.5.1 Función enzimática

Esta enzima está involucrada en la destrucción protectora del  $H_2O_2$  generado durante el metabolismo celular, radiaciones ionizantes y el peróxido producto de la dismutación de radicales  $O_2^{\cdot -}$ . Está caracterizada por una alta capacidad de reacción, pero relativamente baja afinidad por el sustrato. Se le atribuyen dos funciones: catalítica y peroxidativa (Ho *et al.*, 2006). Ambas se pueden representar por la ecuación:



La reacción general entraña la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por el donador y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado (Ho *et al.*, 2006).

La reacción catalítica utiliza sencillamente una molécula de  $H_2O_2$  como sustrato y otra como donador. Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (Ho *et al.*, 2006).



En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído, además de nitritos o mercurio elemental. Esta función se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrameros, prevaleciendo a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ . La reacción predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración del  $H_2O_2$  (Nohl *et al.*, 2005).

La actividad de la CAT puede ser inhibida por el cianuro, la azida, el sulfuro, la hidroxilamina, el paracetamol, la bleomicina, la adriamicina, la benzidina y el paraquat (Titov *et al.*, 2008).

### **1.5.2 Importancia biomédica**

La CAT ha sido ampliamente estudiada en relación con su participación en numerosos procesos patológicos de gran importancia en las investigaciones biomédicas, y está involucrada tanto en la génesis como en las consecuencias de dichos procesos (Mauriz *et al.*, 2007).

En la década pasada se realizaron varios estudios en modelos animales y humanos de isquemia-reperfusión comprobándose la participación de las EROs en la producción de los daños que aparecen durante este proceso, así como la modificación de las enzimas antioxidantes, entre las que se encuentra la CAT. Se ha observado que estas modificaciones no se comportan de igual forma en todos los tejidos (Mauriz *et al.*, 2007).

La acción de la CAT puede suprimir el incremento del calcio intracelular que se produce a través del aumento del  $H_2O_2$  provocado por el daño isquémico a nivel miocárdico (Pogan *et al.*, 2007).

En afecciones respiratorias como el síndrome de distrés respiratorio en adultos, inducido por EROs, se ha encontrado aumento en la actividad de la CAT. Esta enzima previene el aumento de los niveles plasmáticos de tromboxano B2 y 6-cetoprostaglandina y la acumulación de agua extravascular, reduciendo el daño endotelial y con ello el edema pulmonar (Pogan *et al.*, 2007).

Se han realizado estudios que plantean la inducción de proteínas del shock térmico (HSP) como responsables de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. La síntesis de HSP es inducida por las EROs y se observa que una exposición



a estas en presencia de enzimas antioxidantes como la CAT mejora la supervivencia de las células y disminuye la inducción de HSP (Sultana *et al.*, 2006).

En relación con las afecciones tumorales se ha encontrado en pacientes con tumores del tracto gastrointestinal un aumento de la actividad CAT en los estadios iniciales del proceso. Esta actividad disminuía y llegaba a ser mínima en estadios de metástasis diseminada y caquexia. Otros estudios con modelos experimentales han mostrado el importante papel que juegan las EROs en la invasión tumoral y las metástasis y se ha observado que la administración de CAT podía inhibir la formación de metástasis (Kenji *et al.*, 2006).

La actividad de las enzimas con propiedades antioxidantes también ha sido estudiada en modelos experimentales animales de enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitas, donde se han encontrado disminuida la CAT, disminución que podía ser prevenida por la administración de insulina (Van den Branden *et al.*, 2002).

En estudios llevados a cabo en pacientes con IRC se ha encontrado disminución en los niveles séricos de esta enzima pudiéndose deber esto, entre otras causas, a factores genéticos (Van den Branden *et al.*, 2002).

## **1.6 Glutación**

El glutati3n es un trip3ptido constituido por los amino3cidos L-glut3mico, L-ciste3na y L-glicina, en el cual el enlace pept3dico entre el glut3mico y la ciste3na se realiza mediante el grupo carboxilo en  $\gamma$  y no con el que ser3a corriente, el  $\alpha$  carboxilo. Tiene un peso molecular de 307 Dalton y puede presentarse tanto en forma de GSH como de disulfuro oxidado (GSSG). El 99% del glutati3n celular est3 presente en su forma de GSH, sin embargo, al hablar de glutati3n celular, se considera la forma GSH sumada a la GSSG, m3s la porci3n de glutati3n unido a prote3nas. A la suma de esto se le conoce como glutati3n total (Dickinson y Forman, 2006).

El glutatión está presente en grandes cantidades en las células de animales superiores (5 mM) y forma parte del sistema de transporte de aminoácidos al interior celular, catalizado por la  $\gamma$ -glutamyl transferasa, además actúa como reductor de centros activos, activador de enzimas y como protector ante la oxidación de lípidos (Dickinson y Forman, 2006; Derick *et al.*, 2006).

El poder reductor de este tripéptido es debido a la presencia del grupo sulfhídrico (-SH) libre de la cisteína central. Cuando se oxida, dos moléculas de glutatión se unen para formar el GSSG a través de un disulfuro establecido entre las dos cisteínas (Derick *et al.*, 2006).

El glutatión desempeña diversas funciones celulares algunas de las cuales son:

- Activación de linfocitos-T, por lo que juega un papel importante en la respuesta inmune.
- Participa en procesos de regulación de expresión de genes, mediante la regulación de señales de traducción y síntesis de DNA, proteínas y proteólisis.
- Participa en procesos de proliferación celular incluyendo linfocitos y células del epitelio intestinal.
- Participa en procesos apoptóticos.
- producción de citoquinas
- Glutathionilación de proteínas.
- Regulación de la integridad y funcionamiento de la mitocondria.
- Papel importante en la espermatogénesis y maduración espermática.
- Inhibe infecciones producidas por virus.
- Desempeña un papel central en la patogénesis de diversas enfermedades (cáncer, inflamación, deficiencia de proteínas, Alzheimer, Parkinson, enfermedades hepáticas, fibrosis quística, VIH, ataques cardiacos, accidente vascular cerebral de tipo hemorrágico, diabetes), es importante en el metabolismo de nutrientes.

El glutatión es considerado el principal sistema antioxidante de todos los que presenta el hígado. Siendo este órgano su principal sitio de síntesis, almacenamiento y exportación. Es el hígado el encargado de exportarlo mediante el torrente sanguíneo a los diferentes órganos y tejidos que lo requieren, desempeñando de esta forma un papel central en su compleja homeostasis inter-orgánica, a tal grado que el 90% del tripéptido presente en el plasma es aportado por este órgano (Liyun y Neil, 2009).

La importancia de esta molécula radica en el papel central que desempeña en la protección contra el estrés oxidativo, como atrapador de RL y como cofactor de diferentes enzimas antioxidantes como la GPx y la GRd. Se encuentra en diversos órganos como el cerebro, el riñón, el pulmón, el intestino, el bazo, el cristalino y el corazón, también está presente en leucocitos y eritrocitos (Marengo, 2008).

### **1.7 Malonildialdehído**

El malonildialdehído (MDA) es un compuesto de tres átomos de carbono producido principalmente mediante la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados con más de dos dobles enlaces interrumpidos por grupos metilénicos, como por ejemplo el ácido linolénico y el ácido araquidónico. Hasta el momento han sido propuestos varios mecanismos para la formación de MDA a partir de este tipo de ácido graso (Esterbauer, 1991) pero esta no es la única fuente para su producción.

Este dialdehído también puede derivarse de la hidrólisis de pentosas, desoxirribosa, hexosas, de algunos aminoácidos y del ADN. El MDA exhibe una reactividad ubicua con varias biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, además de que es capaz de reducir los niveles celulares de GSH (Esterbauer, 1991).

Los primeros ensayos para determinar este compuesto fueron realizados a finales de los años 50 siendo ampliamente utilizados en la actualidad para el estudio de la peroxidación lipídica en sistemas relacionados con RL.

### **1.8 Estrés oxidativo en pacientes con IRC**

Está claramente constatado que los pacientes con IRC presentan un aumento del EO, producido por una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento de los factores prooxidantes (Zoccali, 2006). Se han dado diversas explicaciones fisiopatológicas a este hecho; algunos lo atribuyen a malnutrición e hipoalbuminemia por presentar, en

estos casos, una disponibilidad disminuida de grupos «tioles» y otros al «estado urémico» *per se* con la retención de solutos tóxicos que activan leucocitos polimorfonucleares, generando así radicales derivados del oxígeno resultando en fagocitosis e inflamación (González *et al.*, 2006). También este estado de estrés puede estar relacionado con la existencia de factores comórbidos como la edad avanzada, diabetes, fenómenos inflamatorios e infecciosos (Couchoud *et al.*, 2007).

En la actualidad se plantea que la respuesta inflamatoria podría ser la causa primaria del EO en pacientes con IRC (De Nicola *et al.*, 2006). Sin embargo esta relación podría ser en sentido contrario. El desbalance entre la formación de RL y su neutralización en estos pacientes podría ser el factor causal para la activación de una cascada inflamatoria por una variedad de factores estimulantes potenciales en uremia y diálisis. Una señalización común ocurre mediante la generación de RL, activación del factor transcripcional nuclear kappa B (NF-B) y la inducción de un número de genes, tales como los de moléculas de adhesión, citoquinas y quimoquinas trayendo como resultado la estimulación en la producción de IL-6 por el hígado (De Nicola *et al.*, 2006).

Estudiando los factores de riesgo cardiovascular en estos pacientes, los cuales presentan una incidencia de complicaciones cardiovasculares ateroscleróticas muy superior a la de la población general (Jungers *et al.*, 2006), se ha observado que junto a los factores tradicionales, los mismos presentan factores intrínsecamente ligados al estado urémico y factores relacionados con el procedimiento de depuración extrarrenal (Prichard, 2006). Estos estarían implicados en el desarrollo de disfunción endotelial (Mahmut *et al.*, 2006) y en la inducción de una reacción inflamatoria sistémica, con especial afectación de la vasculatura (Arici y Walls, 2001). En su conjunto las observaciones precedentes apoyan el concepto de que la IRC es, fundamentalmente, un estado vasculopático (Luke, 2005).

Los pacientes con IRC presentan elevadas concentraciones circulantes de marcadores de estrés oxidativo, incluyendo productos de peroxidación lipídica (Roob *et al.*, 2007) y productos de oxidación avanzada de proteínas (Witko-Sarsat *et al.*, 2006).

La estimulación tanto de la NADH/NADPH oxidasa vascular como fagocítica por las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox) (Galle *et al.*, 2006) es un mecanismo implicado en la generación exagerada de  $O_2^{\cdot -}$  en los pacientes con IRC. De hecho, se han observado niveles anormalmente elevados de este anión en la sangre de los pacientes en

programa de hemodiálisis (Chen *et al.*, 2007). Por otra parte, en los pacientes con IRC se ha descrito un déficit de antioxidantes como el GSH (Ceballos-Picot *et al.*, 2005) y la vitamina C (Jackson *et al.*, 2007).

### **1.9 Alteraciones renales asociadas**

En el caso del riñón, el estrés oxidativo representa un punto de convergencia del mecanismo de daño renal provocado por nefropatías resultantes de muy diversas etiologías. Así, el daño que puede sufrir el riñón expuesto a isquemia, agentes nefrotóxicos o infecciosos, como también a obstrucciones de la vía urinaria, se asocia a un predominio pro-oxidante respecto a las defensas antioxidantes. Un blanco frecuente del ataque de los agentes pro-oxidantes son los lípidos de las membranas de las células renales, ocasionando la peroxidación de estos. Esta lipoperoxidación compromete la integridad de la membrana basal y del epitelio de los órganos, por lo que también puede afectar las funciones de transporte realizadas en el túbulo renal (González *et al.*, 2006).

#### **1.9.1 Alteraciones glomerulares**

El estado de desequilibrio oxidativo puede estar involucrado en lesiones inflamatorias glomerulares causadas por una serie de mediadores, incluyendo citoquinas y quimoquinas, las cuales provocan la activación de leucocitos, producción de EROs y un incremento del daño glomerular. Estas moléculas causan inflamación en respuesta a varios estímulos que se originan de la infiltración leucocitaria (de la Cruz, 2009). Además también podrían ser producidas por células renales, tales como células mesangiales y endoteliales, células epiteliales del túbulo proximal y fibroblastos intersticiales (Ceballos *et al.*, 2006).

Un ejemplo de la producción de citoquinas en las células glomerulares inducida por EROs, está dada por el estímulo del factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), el cual puede mediar el incremento de la permeabilidad de la barrera glomerular a la albúmina (Sharma *et al.*, 2006). Además, se ha documentado que el  $O_2^{\cdot-}$  participa en la apoptosis de las células glomerulares inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Moreno-Manzano *et al.*, 2005). De estos datos se deriva que las EROs están implicadas en la fisiopatología de diversos tipos de lesiones glomerulares, que van desde la inflamación a la apoptosis. Por otra parte, se ha visto que las células mesangiales pueden ser inducidas tanto por ON como por  $O_2^{\cdot-}$ . Sin embargo, la coexistencia de estos dos mediadores

ON/O<sub>2</sub><sup>-</sup> en una proporción definida resulta muy dañina (Sandau *et al.*, 2007), ya que facilitarían la producción de OONO<sup>-</sup> el cual es considerado un agente citotóxicos.

### **1.9.2 Alteraciones túbulo-intersticiales**

El daño túbulo-intersticial es un hallazgo constante en la IRC, indistintamente de la etiología o zona del riñón donde se origine la patología. En esta condición va a existir aparición de macromoléculas en el espacio urinario, debido a que se pierde la selectividad del epitelio glomerular. Así, el epitelio del túbulo renal es expuesto al daño por especies químicas. Entre estas, tenemos las LDL-ox, metales de transición (Shah, 2007), hemoglobina (Barrouillet *et al.*, 2008), o drogas potencialmente nefrotóxicas (Zager y Burkhart, 2007). La exposición de las células tubulares a LDL-ox podría resultar en daño túbulo-intersticial debido a la inducción de un ambiente pro-oxidante. Por otra parte, este estímulo oxidativo podría inducir la activación de la hemo-oxigenasa, una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo de la hemoglobina (Zager y Burkhart, 2007), hemopigmento encontrado en el espacio urinario en numerosas glomerulopatías en las cuales la barrera glomerular está dañada. Posteriormente, la liberación de hierro resulta en la producción tubular de ·OH y lipoperóxidos (Zager y Burkhart, 2007).

Las EROs también juegan un papel importante en la inflamación túbulo-intersticial asociada con la nefropatía obstructiva. El trastorno mecánico que consiste en la obstrucción uretral completa causa daño tubular mediante la promoción de un estado pro-inflamatorio y la consecuente fibrosis túbulo-intersticial. En esta patología se observa un aumento en la producción de EROs aún después de liberar la vía urinaria, produciéndose la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias y quimioatrayentes (Kinter *et al.*, 2005).

Por otra parte existen evidencias de que la angiotensina II también juega un papel crucial en la progresión de las enfermedades renales, incluyendo la nefropatía obstructiva. La angiotensina II media la activación de la NADPH oxidasa unida a membrana y, subsecuentemente, la generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que provoca la hipertrofia de las células del túbulo renal (Kinter *et al.*, 2005).

### **1.9.3 Disfunción endotelial**

Estudios recientes muestran que el incremento en la producción de EROs se ha asociado con la proliferación de las células musculares lisas del endotelio vascular y el desarrollo de hipertensión (Evelson, 2007).

Numerosos efectos de las EROs en la regulación de las funciones vasculares, principalmente de vasodilatación, son mediadas por ON. Este elemento tiene una vida media corta e interactúa eficientemente con grupos -SH de proteínas así como con hemo-proteínas y EROs. Esta interacción con las EROs propicia que al aumentar la producción vascular de una especie reactiva como el  $O_2^{\cdot-}$  se produzca una reducción en la biodisponibilidad del ON impidiendo así la relajación del endotelio (Evelson, 2007).

La fuente de producción vascular de  $O_2^{\cdot-}$  en animales es el endotelio, las células musculares lisas del endotelio, y los fibroblastos de la adventicia. La angiotensina II también puede estimular la producción de este anión por las células del endotelio y del mesangio (Berry, 2006) a través de la activación de la NADPH-oxidasa. Se sabe que el incremento del  $O_2^{\cdot-}$  extracelular, aumentaría su afinidad por ON, siendo removido rápidamente mediante su conversión en  $OONO^{\cdot-}$  (Sandau *et al.*, 2007).

Es así como en el riñón de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, el bloqueo tanto del receptor de angiotensina II como la inhibición de la enzima convertidora previene el desarrollo del daño oxidativo renal, lo que indicaría cierto papel de la Angiotensina II en el EO renal en la nefropatía diabética incipiente (Goran *et al.*, 2007).

Por otra parte, el  $OONO^{\cdot-}$  es reconocido como un potente oxidante de un amplio número de moléculas biológicas y mediador de la toxicidad por ON. Se ha demostrado que  $OONO^{\cdot-}$  es un importante modulador de la actividad de la ciclo-oxigenasa en las células inflamatorias, estableciendo que serviría como un eslabón bioquímico entre el ON y la biosíntesis de prostaglandinas (Onozato, 2007; Goran *et al.*, 2007).

Las últimas evidencias sugieren que la liberación de ON juega un importante papel en la regulación fisiológica de la vasculatura renal, función que determina la respuesta vasomotora del riñón. De acuerdo a esto, se esperaría una modulación de esta respuesta mediante la administración de antioxidantes (por remoción de  $O_2^{\cdot-}$  y/o radicales  $OONO^{\cdot-}$ ). Estudios epidemiológicos han sugerido que una terapia con antioxidantes podría disminuir la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Goran *et al.*, 2007) en ratas, a través de un aumento en la expresión de la sintetasa del ON (Onozato, 2007).

## **Capítulo 2. Materiales y Métodos.**

Se realizó una investigación de desarrollo a partir de un proyecto ramal insertado en el programa de Enfermedades Crónicas No Trasmisibles, en el período comprendido entre enero de 2010 y diciembre de 2012, la cual fue desarrollada en el Laboratorio de Investigación de Química Sanguínea de la Unidad de Investigaciones Biomédicas (UNIB) ubicada en la Universidad de Ciencias Médicas “Dr. Serafín Ruiz de Zárate Ruiz” de Villa Clara en conjunto con el Laboratorio Clínico del Hospital Universitario “Arnaldo Milián Castro” de Santa Clara.

La investigación, constituyó un estudio analítico transversal. Se diseñó para dos etapas. Primera: determinar los parámetros de EO mediante la cuantificación de las actividades enzimáticas SOD y CAT así como los niveles de GSH y MDA en muestras de suero extraídas a pacientes diagnosticados con IRC en estadios de prediálisis y hemodiálisis. Y segunda: comparar mediante procedimientos estadísticos los resultados de EO en los grupos de estudio y un grupo control.

### Muestra utilizada

Para el estudio se utilizaron 174 muestras, conformándose tres grupos. En los dos primeros se incluyeron individuos con IRC (prediálisis y hemodiálisis), procedentes de las consultas de Nefrología de la provincia de Villa Clara, con edades comprendidas entre 19 y 75 años. El grupo de prediálisis estuvo constituido por 47 muestras de sangre de 27 mujeres y 20 hombres y el grupo de hemodiálisis por 54 muestras de 20 mujeres y 34 hombres. Las causas que originaron la IRC son las habituales en esta población, entre las que encontramos la Glomerulopatía primaria, Nefropatías, Enfermedad Renal Poliquística Autosómica Dominante, Hipoplasia Renal, Amiloidosis Renal y enfermedades de etiología no filiada (Hipertensión arterial y Diabetes mellitus). Teniendo en cuenta que el 97% de los individuos enfermos involucrados en la investigación son hipertensos, lo cual podría tomarse al mismo tiempo como causa y efecto del daño renal.

El tercer grupo estuvo constituido por muestras de 73 adultos aparentemente sanos, 37 mujeres y 36 hombres, con edades comprendidas entre 20 y 70 años. Tomados al azar de un estudio de pesquiasaje realizado por el grupo PROCDEC II para estudiar



alteraciones relacionadas con la hipertensión arterial en la población de nuestro municipio.

La edad promedio del total de individuos seleccionados para la investigación fue de 47,36 años. De ellos 64 fueron del sexo femenino y 56 del sexo masculino, para un 36,8% y un 32,2% respectivamente.

La selección de la muestra de sangre se realizó considerando los siguientes criterios de inclusión y rechazo definidos para este estudio.

Criterios de inclusión:

Se incluyeron muestras de:

- pacientes de ambos sexos clasificados, según criterio médico con IRC, con edades comprendidas entre 19 y 75 años que se mantuvieron clínicamente estables en los tres meses previos al estudio.
- pacientes en estadio de prediálisis y hemodiálisis, estos últimos con no menos de 3 meses de tratamiento.
- personas aparentemente sanas de ambos sexos sin ninguna patología crónica, con edades comprendidas entre 20 y 70 años que al momento de la extracción no se encontraban bajo los efectos de ningún medicamento.
- todo sujeto participante en el estudio que haya dado su consentimiento informado para la investigación.

Criterios de rechazo:

Se rechazaron las muestras de:

- pacientes con enfermedad inflamatoria o infecciosa, neoplasias y sangrado activo.
- pacientes con IRC con más de 5 años en hemodiálisis.
- suero con presencia de interferentes analíticos potenciales tales como ictericia, turbidez, lipemia y hemólisis.

La muestra de sangre total periférica (7 mL) de los sujetos involucrados en el estudio fue extraída mediante veno-punción utilizando jeringuillas desechables y después de al menos

4 horas de ayuno. Las mismas fueron vertidas en tubos de cristal de 13 x 100, sin anticoagulante.

Para obtener el suero se dejó coagular la sangre contenida en el tubo de ensayo, entre 30 minutos y 1 hora a partir de la extracción, período en el cual el coágulo producido se retrajo liberándose el suero. Cuidadosamente, con el auxilio de una varilla de vidrio, se despegó el coágulo de las paredes del tubo y se centrifugó durante 10 minutos a 3 000 rpm en una Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415 R). El suero obtenido se almacenó en viales plásticos tipo Eppendorf con tapa.

Las muestras fueron transportadas en termo refrigerado hasta el laboratorio de análisis, las que no fueron utilizadas en el día se congelaron a -20 °C en un freezer para su posterior análisis. La descongelación se realizó en baño de hielo con el objetivo de mantener la temperatura adecuada para evitar la desnaturalización de las proteínas.

Para cada muestra estudiada, además del registro de entrada que acompañó la sangre, se consultaron las historias clínicas de cada individuo enfermo de las cuales se tomaron datos personales y específicos. (Anexo 1).

## **2.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados**

### **2.1.1 Determinación de la actividad SOD**

La determinación de la actividad sérica de la enzima se realizó mediante el método cinético descrito por Marklund en 1990. El mismo se basa en la autooxidación del compuesto aromático Pirogalol o ácido Pirogálico ( $C_6H_6O_3$ ) en soluciones aerobias catalizadas por el anión  $O_2^{\cdot-}$ . Esta reacción da lugar a la purpurogalina, compuesto amarillo marrón que absorbe la luz a una longitud de onda de 420 nm. Este proceso resulta inhibido por la actividad SOD. El grado de inhibición es utilizado para evaluar la actividad de la enzima presente en la muestra.

Como operación preliminar se procedió a deslipidar la muestra, se utilizó para ello una mezcla de cloroformo y metanol seguido de agitación en vortex y centrifugado a 6 000 rpm en la centrífuga refrigerada durante 15 minutos a 4 °C.

La determinación se llevó a cabo mezclando en una cubeta de cuarzo (1cm) 50  $\mu$ L de

suero con 900  $\mu\text{L}$  de Tampón Tris-HCl (hydroxymethyl aminomethane 0.2 M; HCl 37 %) ajustado en pH-Metro (E 516 Titriskop) a 8.20 y 50  $\mu\text{L}$  de la solución de pirogalol 4 mM. Después de 10 segundos de reacción se midió la diferencia de densidad óptica ( $\Delta\text{DO}$ ) en un Espectrofotómetro (Genesys 10uv) durante un minuto a 420 nm.

Para el ensayo blanco se siguió el mismo procedimiento sustituyendo el volumen de suero por agua destilada.

La actividad enzimática se calculó mediante la ecuación:

$$\text{AE} = (\% \text{ de inhibición de la autooxidación} \times 2) / 5 = U_{\text{AE}}/\text{mL}/\text{min}$$

Donde:

$$\% \text{ de inhibición de la autooxidación} = 100 - \% \text{ de oxidación}$$

$$\% \text{ de oxidación} = (\Delta\text{DO muestra} / \Delta\text{DO blanco}) \times 100 \%$$

La actividad enzimática específica viene dada por la ecuación:

$$\text{AE específica} = \text{AE} / \text{Conc. (Proteínas)} = U_{\text{AE}}/\text{mg de prot.}$$

### **2.1.2 Determinación de la actividad CAT**

La determinación de la actividad enzimática se realizó por el método descrito por Aebi en 1974 el cual se basa en la capacidad de esta oxidoreductasa de descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Esta reacción es de primer orden y la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato descompuesto es directamente proporcional a la concentración de enzima. Se sigue la variación de absorbancia (DO) que tiene lugar durante la descomposición del sustrato.

Se mezcló en cubeta de cuarzo 50  $\mu\text{L}$  de muestra con 950  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM a pH 7.0 y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %. Luego de homogenizar manualmente, se leyó la absorbancia a los 10 y a los 70 segundos de comenzada la reacción a una longitud de onda de 240 nm en el espectrofotómetro utilizado en el acápite 2.1.1. Para el ensayo blanco se mezcló 1000  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 50 mM pH 7.0 con 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % siguiendo el mismo procedimiento para la lectura.

En presencia de actividad enzimática se observó una disminución de la DO del medio.

El cálculo se realizó mediante la ecuación:

$$\text{AE} = [(\Delta\text{DO}/\Delta t) / \epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}] \times [V_f \times \text{dil}] / V_E$$

Donde:

$\epsilon_{H_2O_2}$  = Coeficiente de extinción del peróxido de hidrógeno

#### Determinación de proteínas totales

La determinación de la concentración de proteínas totales para el cálculo de las actividades enzimáticas específicas se realizó por el método descrito por Lowry en 1951, el cual se basa en la reacción del reactivo Folin-Ciocalteau con fenoles, tales como la tirosina en las proteínas.

#### **2.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH**

La determinación de la concentración de GSH se realizó por el método descrito por Beutler en 1986. El GSH presente en la muestra desproteinizada reacciona con el reactivo de Ellman [5,5'-Dithiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB)] para rendir un compuesto coloreado [ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)] que absorbe la luz a 412 nm. La concentración de GSH se cuantifica utilizando una curva patrón.

Como operación preliminar se procedió a la desproteinización de la muestra, adicionando a un volumen de la misma igual cantidad de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % seguido de agitación en vortex y centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante con micro pipetas ajustables eppendorf y se estabilizó el pH adicionando 50  $\mu$ L de Trietanolamina (TEAM) 4 M. Luego de agitar manualmente, el sobrenadante se almacenó en viales plásticos a -20 °C en freezer hasta el momento del ensayo.

Para determinar los niveles de GSH se mezcló 1 450  $\mu$ l de buffer fosfato 250 mM; EDTA 5 mM pH 8 con 25  $\mu$ L de muestra y 25  $\mu$ L de DTNB 10 mM se agitó aproximadamente 1 minuto en vibroagitador. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 412 nm.

El cálculo de la concentración de GSH en  $\mu$ M se realizó extrapolando las densidades ópticas en la curva patrón mediante la ecuación:

$$(DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{blanco}}) - \text{Intercepto} / \text{pendiente de la curva}$$

#### **2.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA**

La técnica se basa en la reacción de dos moléculas del reactivo cromogénico N-metil-2-fenil indol con una molécula de MDA a 45 °C, conduciendo a la formación de un cromóforo estable con un máximo de absorbancia en los 586 nm.

Para la determinación se mezcló en tubos de reacción 200 µL de muestra con 650 µL de N-metil-2-fenil Indol 10.3 mM seguido de vibroagitación. Posteriormente se añadió ácido clorhídrico al 35 % y se incubó en baño de María a una temperatura de 45 °C durante un período de 1 hora. Luego de este tiempo la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 3 000 rpm durante 15 minutos. La absorbancia se leyó a 586 nm contra blanco reactivo y la concentración de MDA se cuantificó mediante una curva patrón de 1,1,3,3-tetramethoxypropan [Malonaldehyde bis(dimethyl acetal)] 101 µM, para lo que se utilizó la ecuación:

$$(DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{blanco}}) - \text{Intercepto} / \text{pendiente de la curva}$$

Todos los reactivos empleados en las determinaciones fueron suministrados por la firma Merck (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany).

#### Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos para la comparación de los grupos se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 18.0 para Windows® XP Titan Ultimate donde fue creada la base de datos. Se determinaron los estadísticos de grupo para cada variable en estudio y se realizaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk y Lilliefors) para conocer la distribución de los datos. Como los datos no seguían una distribución gaussiana, las comparaciones se realizaron mediante pruebas no paramétricas específicamente por el test de Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%.

#### Aspectos éticos a tener en cuenta

La investigación fue diseñada teniendo en cuenta los aspectos éticos para el trabajo en humanos, aprobándose por el Comité de Ética de la UNIB. El equipo multidisciplinario de investigadores dio las explicaciones reales y objetivas del estudio a los individuos incluidos en el mismo, los cuales emitieron su autorización por escrito (Anexo 2), se respetó el principio de autonomía.

## Capítulo 3. Resultados.

### 3.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados

#### 3.1.1 Determinación de la actividad SOD

La Fig. 2 muestra las comparaciones de los valores de actividad enzimática SOD entre los grupos con IRC (prediálisis y hemodiálisis) con los del grupo control, donde se evidenció una disminución significativa de un 30,77% en el primer caso y muy significativa de un 40,00% en el segundo, para una  $p=0,023$  y  $p=0,000$  respectivamente. En cuanto a la comparación de los valores entre los grupos de estudio también se demostró que existía una disminución, aunque no significativa de un 13,33% para  $p=0,068$ .

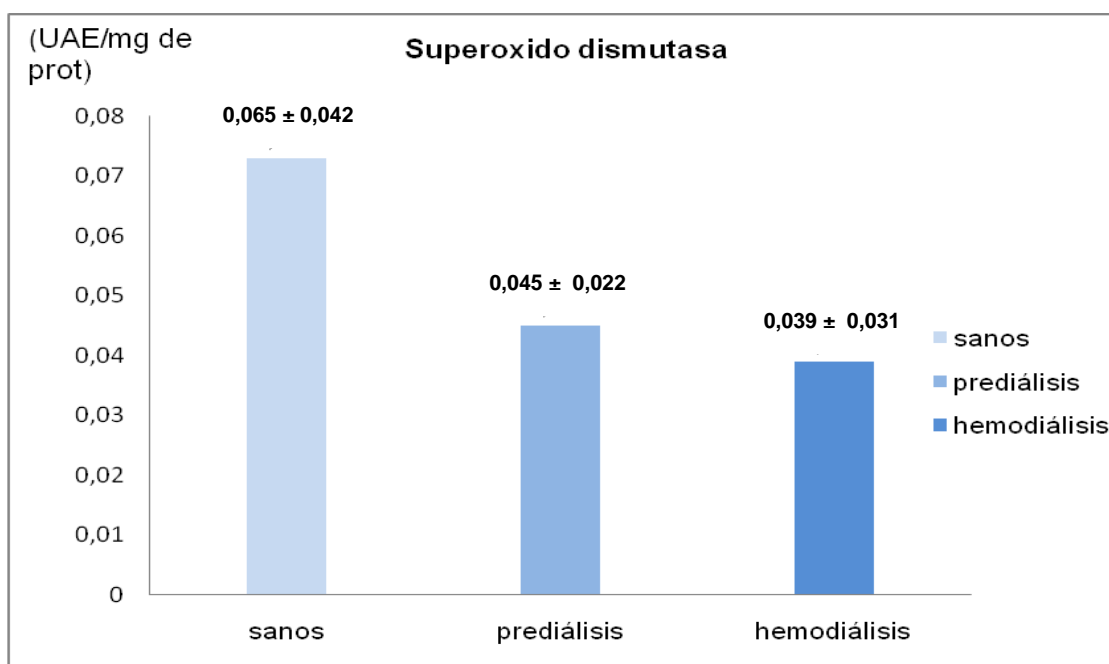


Figura 2. Valores medios  $\pm$  desviación estándar de la actividad enzimática específica de SOD (unidades de actividad enzimática por miligramos de proteína), en los grupos de prediálisis, hemodiálisis y control.

#### 3.1.2 Determinación de la actividad CAT

La comparación de los valores de actividad enzimática CAT entre los grupos de estudio y el grupo control se muestran en la Fig. 3, donde se evidenció que también existía una disminución, no significativa, entre prediálisis-sanos con una diferencia de 16,51% para

$p=0,050$ , pero significativa entre hemodiálisis-sanos con una diferencia de 19,97% para  $p=0,040$ . Al comparar ambos grupos de enfermos, nuevamente se comprobó la existencia de una disminución, aunque no significativa, de un 4,14% para una  $p=0,878$  en este caso.

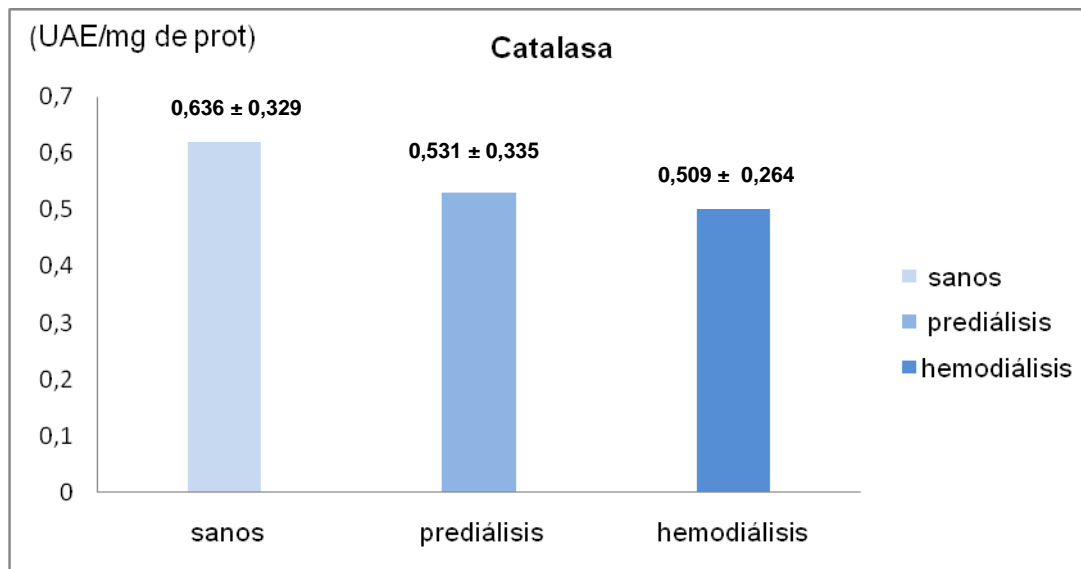


Figura 3. Valores medios  $\pm$  desviación estándar de la actividad enzimática de CAT (unidades de actividad enzimática por miligramos de proteína), en los grupos de prediálisis, hemodiálisis y control.

### 3.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH

Concentraciones de GSH en los grupos de prediálisis, hemodiálisis y control, se muestran en la figura 4. Los valores de concentraciones de glutatión reducido en los individuos de prediálisis y hemodiálisis al compararse con los del grupo control permitieron demostrar que habían disminuciones significativas de 18,09% y 18,44% para una  $p=0,031$  y  $p=0,033$  en ambos casos respectivamente. Para el momento en que se confrontaron los valores de las concentraciones entre los pacientes, igualmente se demostró una depresión, aunque no significativa, de un 0,42% para una  $p=0,785$ .

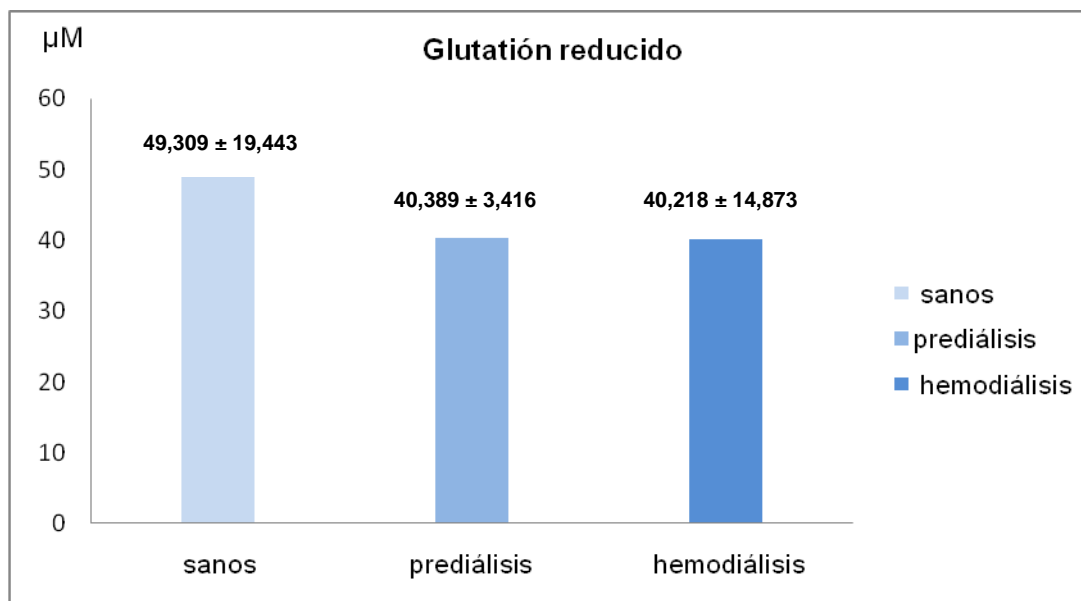


Figura 4. Concentraciones medias  $\pm$  desviación estándar de GSH en (micro-molar), en los grupos de prediálisis, hemodiálisis y control.

### 3.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA

Concentraciones de MDA en los pacientes con IRC y grupo control, se muestran en el gráfico 5. Al comparar los grupos de estudio (prediálisis y hemodiálisis) con el control se mostró un aumento muy significativo de un 121,99% y 344,33% respectivamente para una  $p=0,000$  en ambos casos. También se demostró que en el grupo de hemodiálisis existía un acrecentamiento de un 100,16% del MDA con respecto a prediálisis para una  $p=0,000$ .



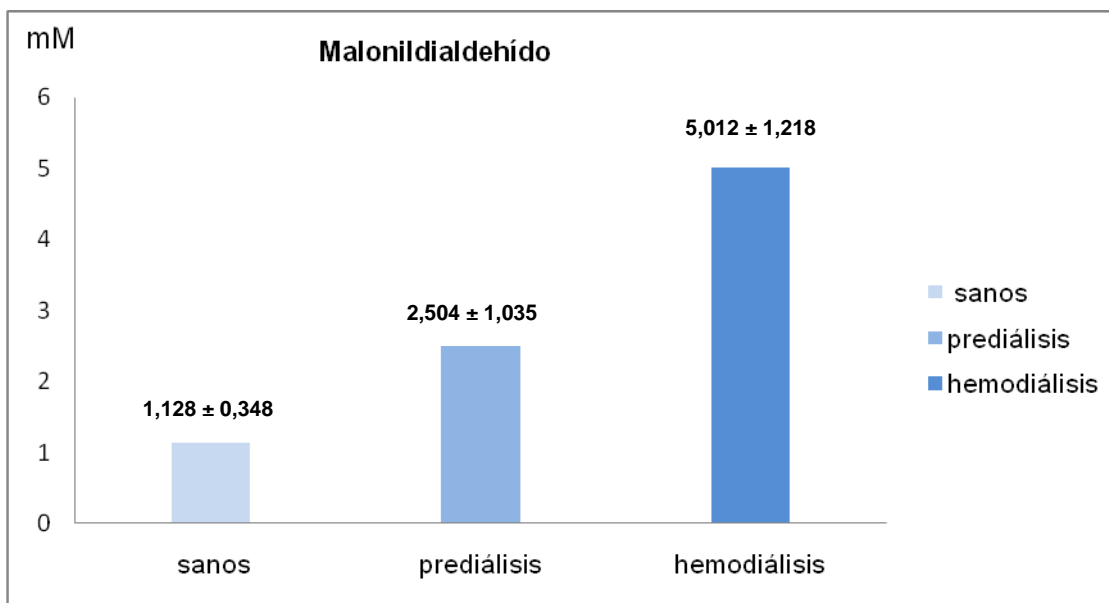


Figura 5. Concentraciones medias  $\pm$  desviación estándar de MDA (mili-molar), en los pacientes con IRC (prediálisis y hemodiálisis) y grupo control.

## **Capítulo 4. Discusión.**

### **4.1 Cuantificación de los parámetros séricos estudiados**

#### **4.1.1 Determinación de la actividad SOD**

La disminución de la actividad de la enzima antioxidante SOD muestra un desbalance oxidativo en los pacientes con IRC que podría ser consecuencia de una elevada producción de EROs. Esta afirmación está basada en reportes que demuestran un incremento en la expresión y actividad de la NADPH oxidasa en pacientes y modelos animales con IRC (Fortuno *et al.*, 2005; Castilla *et al.*, 2008). Además se ha demostrado que la presencia de polimorfismo genético en la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa está asociado al estrés oxidativo en estos pacientes (Grahl *et al.*, 2007). Este polimorfismo también ha sido asociado con complicaciones tales como el requerimiento de procedimientos dialíticos o incluso la muerte en pacientes con fallo renal agudo (Perianayagam *et al.*, 2007).

Numerosas evidencias experimentales aún no dejan claro si un sistema de defensa antioxidante dañado y por tanto sobrepasado por la producción de EROs es el responsable del estrés oxidativo en estos pacientes (Dounousi *et al.*, 2006; Karamouzis *et al.*, 2008). En estudios recientes se ha encontrado que individuos afectados con IRC en programa de hemodiálisis muestran una concentración elevada de peróxidos lipídicos en plasma, así como LDL-ox en comparación con sujetos controles lo cual implica la existencia de un estatus redox alterado. Sin embargo en trabajos realizados por Karamouzis y colaboradores (2008) no se han observado diferencias en la capacidad antioxidante plasmática total de estos pacientes. No obstante existen evidencias que plantean una reducción de los niveles plasmáticos de SOD (Dounousi *et al.*, 2006; Lahera *et al.*, 2006) en pacientes con IRC. Esta aparente contradicción puede ser explicada por el hecho de que la capacidad antioxidante total cuantifica niveles de antioxidantes tanto hidrosolubles como liposolubles tales como las vitaminas (E y C), proteínas, lípidos, glutatión y ácido úrico. Por tanto el incremento de los niveles de ácido úrico debido al estado urémico en la IRC pudiera compensar la disminución potencial de otros factores de la defensa antioxidante tales como vitaminas y enzimas debido a la malnutrición que estos pacientes enfrentan (Rambod *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados en la literatura consultada donde se ha demostrado que la actividad de la enzima SOD en suero de pacientes con IRC en estadio terminal se ve reducida (Puchades, 2009; Donousi *et al.*, 2006). También se plantea que esta reducción podría deberse a factores de origen genético como lo refiere en su trabajo Van Den Branden y colaboradores (2002) al demostrar una reducción en la expresión de los genes que codifican para la enzima en afectados con IRC. Moradi y colaboradores (2009) han encontrado recientemente un descenso de hasta un 50% en los valores de SOD además de otras moléculas con capacidad antioxidante en una muestra de pacientes en hemodiálisis.

Un mecanismo posible para la afectación de la actividad SOD en estos pacientes se origina por la interacción del anión  $O_2^{\cdot-}$  y el ON. En situaciones de normalidad la concentración de SOD es 300 veces mayor que la del ON, lo que determina que la responsabilidad del metabolismo del  $O_2^{\cdot-}$  recaiga sobre esta enzima, a pesar de que la tasa de reacción entre este anión y el ON es tres veces mayor que la que presenta su interacción con la SOD (Song *et al.*, 2009). De esta forma, el ON, por su condición de radical poco reactivo, realiza actividad antioxidante y muestra su faceta más beneficiosa. Su actuación es capaz de detener reacciones de peroxidación lipídica de las membranas celulares confiriéndoles estabilidad; además le permite prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), evitando un factor de riesgo cardiovascular importante.

En determinadas situaciones como las presentes en los individuos con IRC, en los cuales se ha reportado una activación de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, se produce un aumento en la generación de  $O_2^{\cdot-}$  y de ON, este último por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hakan *et al.*, 2006; Ahmet *et al.*, 2008). De esta forma la reacción entre ellos se hace inevitable, formándose el  $OONO^{\cdot}$ .

Se ha demostrado experimentalmente que este elemento es capaz de reaccionar con proteínas que contienen iones metálicos como hierro, cobre, zinc y manganeso provocando así modificaciones que pueden inducir cambios conformacionales en la estructura tridimensional que acarrear la pérdida de la función biológica.

Mediante la exposición de proteínas purificadas a  $\text{OONO}^-$ , se ha determinado que esta especie es capaz de inactivar una gran variedad de enzimas entre las que se encuentra la SOD (Onozato, 2007).

Además de la inactivación de enzimas, la formación de  $\text{OONO}^-$  reduce la biodisponibilidad de ON lo cual origina disfunción endotelial (Onozato, 2007). En esta condición la permeabilidad vascular cambia y posibilita la entrada de las LDL al interior de la íntima donde son oxidadas y transformadas en moléculas altamente aterogénicas que inician un proceso inflamatorio en el vaso (Hansson, 2005). Esto trae consigo la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos con su posterior unión a células de inflamación circulantes, las cuales migran hacia el espacio subendotelial. Los monocitos son entonces transformados en células espumosas por la incorporación de las LDL-ox formando una estría grasa que es el primer cambio estructural en el proceso aterogénico (Hansson, 2005). Este proceso es considerado el factor de riesgo principal en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular asociado a los pacientes con IRC.

Otro factor a tener en cuenta en la disminución de la actividad enzimática SOD en estos pacientes es la pérdida paulatina de la capacidad de ingerir y asimilar oligoelementos, tales como el cobre, cinc y selenio a lo largo del desarrollo de la enfermedad lo cual trae consigo afectación en la actividad de esta metaloenzima.

### **3.1.2 Determinación de la actividad CAT**

Estudios de la enfermedad renal progresiva en ratones deficientes en CAT han demostrado que la pérdida de la actividad de esta enzima conduce a un incremento en la generación de productos del metabolismo oxidativo así como un aumento significativo del estrés, la esclerosis glomerular y el daño túbulo-intersticial aumentando la severidad de la fibrosis renal (Kobayashi *et al.*, 2005).

En estudios realizados en médula renal se ha observado que una deficiencia en CAT favorece la acción vasoconstrictora del  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuyendo el flujo sanguíneo en esta área y reduciendo la excreción de sodio, lo cual puede conducir a la hipertensión (Zou *et al.*, 2002). Este resultado indica que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de hecho un vasoconstrictor de la médula renal por lo que sería uno de los factores principales del daño asociado con el EO en esta región del riñón en condiciones patológicas.

La disminución progresiva de la actividad antioxidante de CAT evidenciada en los pacientes de prediálisis y hemodiálisis con respecto a los del grupo control corrobora el deterioro de la función renal, teniendo en cuenta que su supervivencia depende del tratamiento renal sustitutivo cuyo proceso de depuración está basado en el peso molecular de las sustancias, en el coeficiente de cribado de la membrana y en las características hidrofóbicas o hidrofílicas de la misma.

Se ha postulado que esta situación se relaciona con la acidosis y/u otras alteraciones inherentes al estado urémico (Perianayagam *et al.*, 2007). Se ha publicado también que la hemodiálisis puede agravar el EO vinculado a la uremia, relacionándose este empeoramiento con el incremento de las EROs generadas por el contacto de los neutrófilos circulantes con las membranas de diálisis (Perianayagam *et al.*, 2007; Lahera *et al.*, 2006). Adicionalmente, la hipotensión intradialítica podría generar una sobreproducción de EROs, originadas en el mecanismo de isquemia-reperusión (Hakan *et al.*, 2006). Más aún, sabiendo que el hierro cataliza la generación de EROs altamente tóxicas, la administración regular de suplementos de  $Fe^{2+}$  a los pacientes en hemodiálisis podría ser co-responsable del aumento del EO de esta población (Shah, 2007).

Los pacientes sometidos a hemodiálisis por lo general están malnutridos, por lo que cuentan con reservas deficientes en vitaminas y minerales que tienen una importancia capital en los mecanismos de defensa antioxidante (Rambod *et al.*, 2008). Se ha demostrado una marcada disminución de vitamina E, ácido ascórbico y glutatión reducido en estos pacientes (Castilla *et al.*, 2008). Además, la hemodiálisis no logra corregir totalmente la toxicidad urémica y por el contrario el propio procedimiento tiene algunos efectos negativos. Se ha demostrado recién la acumulación de sustancias de naturaleza prooxidante en sangre y otros tejidos. Estos incluyen la homocisteína capaz de generar  $H_2O_2$  durante su metabolismo, la carboximetilisina y la pentosidina. Estos compuestos se producen como consecuencia de la glicosidación y autoxidación de carbohidratos, lípidos y proteínas. Estos a su vez pueden provocar la activación de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos capaces de generar grandes cantidades de EROs.

La generación excesiva de sustancias prooxidantes, así como el déficit o la pérdida (en diálisis) de sustancias antioxidantes, son las responsables de generar EO y producir

daños moleculares irreversibles. En los pacientes que reciben tratamiento renal sustitutivo pueden estar implicados diferentes factores añadidos que influyan en la generación de este estrés, como la retrofiltración de líquido de diálisis no ultrapuro, con el consiguiente paso de endotoxinas y activación del sistema del complemento, la pérdida de sustancias antioxidantes a través de membranas de alta permeabilidad o la infusión de grandes cantidades de hierro intravenoso, etc.

También se plantea que esta reducción en la actividad enzimática CAT podría deberse a factores de origen genético, como lo refiere en su trabajo Van Den Branden y colaboradores (2002) al demostrar una reducción en la expresión de los genes que codifican para la enzima en afectados con IRC.

### **3.1.3 Determinación de los niveles séricos de GSH**

La concentración de GSH se comporta de manera similar a la de las enzimas, con una disminución en los dos grupos de pacientes con IRC al ser comparados con el grupo control.

El GSH es un barredor de  $O_2^-$  que protege a los lípidos de las membranas, así como los grupos tioles proteicos de la peroxidación. Este antioxidante no enzimático tiene el papel principal en la restitución de otros antioxidantes como la vitamina E y el ácido ascórbico a su estado reducido. Existen numerosos reportes que indican que el daño a tejidos inducido por diversos estímulos está acompañado de un agotamiento del GSH (Ceballos-Picot *et al.*, 2005; Zachara *et al.*, 2006).

Se ha reportado que los niveles de GSH y las actividades de las enzimas GRd y GPx, las cuales son constituyentes críticos en el ciclo redox del GSH, se ven significativamente reducidas producto al EO sugiriendo que, en estos casos, la afectación al mecanismo de defensa antioxidante puede permitir un aumento en el daño a tejido promovido por los RL (Ceballos-Picot *et al.*, 2005). Lo anterior está en relación con los resultados experimentales hallados en el grupo de individuos con IRC, en los cuales la disminución de la concentración de GSH puede ser debida al consumo de este antioxidante durante el estado de estrés inducido por la enfermedad o debido al propio proceso de diálisis. Además la producción de  $OONO^-$ , en las condiciones discutidas anteriormente, puede traer consigo una disminución en los niveles de GSH ya que esta especie reactiva es

capaz de oxidar moléculas que actúan como cofactores para diferentes enzimas entre las que se encuentra la GPx (Yu *et al.*, 2005).

#### **3.1.4 Determinación de los niveles séricos de MDA**

En el suero de los pacientes con IRC se aprecia un incremento de la peroxidación lipídica expresada en un aumento significativo de los niveles de MDA. Este resultado concuerda con lo reportado por varios autores los cuales han hallado niveles elevados de este indicador en pacientes con esta patología (De Vecchi *et al.*, 2009). Sin embargo algunos trabajos plantean que, a pesar de ser el MDA un óptimo marcador de EO, es una molécula de bajo peso molecular e hidrosoluble que puede sufrir aclaramiento renal o ser dializada. Recientemente, de Vecchi y colaboradores (2009) proponen la cuantificación de la molécula de MDA ligada a macromoléculas como método más idóneo impidiendo así su aclaramiento.

En el estudio realizado por Samouilidou y colaboradores (2003) en 31 pacientes en hemodiálisis fue demostrado un aumento de las concentraciones de MDA en suero en comparación con un grupo control. A su vez varios equipos de investigadores (Jung *et al.*, 2004; Usberti *et al.*, 2002) han sugerido que este incremento de los niveles de MDA podría ser un indicador del riesgo cardiovascular asociado a estos pacientes, empleándose esta molécula como un predictor de la morbi-mortalidad cardiovascular de los pacientes urémicos (McCullough *et al.*, 2008; Chertow *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la concentración plasmática de MDA no solo constituye un importante marcador de EO, sino que además puede ser utilizado como un indicador de la progresión del proceso aterosclerótico. Es conocido que la formación de placas ateroscleróticas está estrechamente relacionada con elevadas concentraciones de MDA, como resultado de la interacción de EROs con los lípidos retenidos en la lesión ateromatosa. También se ha podido comprobar que al elevarse la concentración de MDA se favorece la inestabilidad de la placa y contribuye a la aparición de eventos trombóticos.

La elevación en los niveles de MDA puede ser originada por un incremento en la producción de  $O_2^-$  con su consecuente daño a lípidos (Lee y Kim, 2006; Donousi *et al.*, 2006) así como por un deficiente sistema de defensa antioxidante como se ha discutido anteriormente.

Uno de los efectos biológicos más estudiados del tratamiento dialítico es la peroxidación lipídica. Se ha demostrado un incremento de los lipoperóxidos en plasma y membranas de células sanguíneas de los pacientes que se someten a hemodiálisis. Se ha descrito también que la apoptosis de los leucocitos de sangre periférica, característica de estos pacientes, está asociada con el EO, por depleción intracelular de grupos tiol. Todo esto contribuye a que el paciente avance hacia un empeoramiento progresivo.

Los pacientes en hemodiálisis por IRC, tienen un aumento del EO, por una inadecuada eliminación de las EROs continuamente generadas (Samouilidou y Grapsa, 2003; De Vecchi *et al.*, 2009). El contacto entre la membrana dializadora y los componentes séricos y los polimorfonucleares, produce una activación del complemento, producción de citokinas y de RL del oxígeno. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño de las células endoteliales, y a un continuo EO (Jung *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que la peroxidación lipídica y las lipoproteínas pueden ser importantes moduladores en la IRC progresiva (De Vecchi *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2004).



**Conclusiones**

1. La actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT se encontraron significativamente disminuidas en el grupo de pacientes con IRC, lo que evidencia un déficit en el sistema de defensa antioxidante enzimático.
2. Existe una reducción significativa de los niveles de GSH, así como un aumento también significativo de la concentración de MDA en los pacientes con IRC, lo cual es indicador de daño a biomoléculas, en este caso a lípidos.

**Recomendaciones.**

1. Determinar la existencia de daño oxidativo a proteínas y ADN en los individuos con IRC mediante la determinación de sus productos avanzados de oxidación.
2. Determinar la actividad pro-oxidante de la enzima fosfolipasa A2 y su influencia en la condición de estrés oxidativo encontrada en los pacientes con IRC.

**Referencias bibliográficas.**

- Asaba, K., A. Tojo, M. L. Onozato, A. Goto y T. Fujita (2007): Doubleedged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 49: 13–19.
- Arici, M y J. Walls (2001): End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? **Kid. Internat.** 59: 407-414.
- Aebi, H (1974): Catalase Methods of Enzymatic Analysis II. Academic Press, New York. NY. 673– 683.
- Ahmet, G., U. Bulent, A. Etlik, A. Ozgur y A. Etlik (2008): Scavenging of Peroxynitrite Reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury. **Ren. Fail.** 30: 747–754.
- Beamer, C. A y A. Holian (2005): Scavenger receptor class A type I/ II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 289: 186–195.
- Bulbul, C. y N. C. Deb (2007): Oxidative Modification of Proteins: Age-Related Changes. **Gerontology.** 53: 128-139.
- Barrouillet, M., A. Moiret y J. Cambar (2008): Protective effects of polyphenols against cadmium-induced glomerular mesangial cell myocontracture. **Arch. Toxicol.** 73: 485-488.
- Berry, C (2006): Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. **Circul.** 101: 2206-2212.
- Couchoud, C., O. Moranne, L. Frimat, M. Labeeuw, V. Allot y B. Stengel (2007): Associations between comorbidities, treatment choice and outcome in the elderly with endstage renal disease. **Nephrol Dial Transplant.** 22: 3246.
- Crimi, E., V. Sica y S. Williams-Ignarro (2006): The role of oxidative stress in adult critical care. **Free Radic Biol Med.** 40: 398–406.
- Ceballos-Picot, I., V. Witko-Sarsat y M. Merad-Boudia (2005): Glutathione antioxidant system as a marker of uremia progression and oxidative stress in chronic renal failure. **Free Radic. Biol. Med.** 21: 845-863.

- Ceballos, G., I. Ramírez, C. C. Calzada y I. M. Olivares (2006): Disfunción endotelial y estrés oxidativo. **Rev. Endocrinol Nutr.** 14 (4): 233-236.
- Castilla, P., A. Dávalos y J. L. Teruel (2008): Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. **Am J Clin Nutr.** 87: 1053–1061.
- Chen, M. F., C. L. Chang y S. Y. Liou (2007): Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. **Blood Purif.** 16: 290-300.
- Chertow, G. M., S. H. Soroko y E. P. Paganini (2006): Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. **Kid. Internat.** 70: 1120–1126.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini y A. Milzani (2006): Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin Chem;** 52: 601-623.
- Dean, P. J (2006): Redefining Oxidative Stress. **Antioxid & Redox Sign.** 8(9 & 10): 1865-1879.
- Den Hertog, J., A. Groen y T. van derWijk (2005): Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases. **Arch Biochem Bioph.** 434: 11–15.
- Dickinson, D. A y H. J. Forman (2006): Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem. Pharm.** 64: 1019-1026.
- Derick, H., H. Naoko, S. Behnam y Neil Kaplowitz (2006): Role of glutathione redox status in liver injury. **Am J. Phy. Gastrointest Liver Physiol.** 291: G1–G7.
- De Incola, L., R. Minutolo, P. Chiodini, C. Zoccali, P. Castellano y C. Donadio (2006): Global approach to cardiovascular risk in chronic kidney disease: reality and opportunities for intervention. **Kid. Internat.** 69: 538-45.
- Dounousi, E., E. Papavasiliou y A. Makedou (2006): Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. **Am J. Kid. Dis.** 48: 752–760.
- Donousi, E., E. Papavasiliou, A. Makedou y K. Ioannou (2006): Oxidative Stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. **Am J. Kid. Dis.** 48(5):752-60.

- De Vecchi, A. F., F. Bamonti y C. Novembrino (2009): Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. **Nephrol. Dial. Transplant.** Advance Access published on March. 4, doi: 10, 1093.
- Dasgupta, A., S. Hussain y S. Ahmad (1992): Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. **Nephron.** 60: 56-9.
- De la Cruz, L. C (2009): Trimetazidine effect on nephrotoxicity by gentamicyn. **Acta bioquím. clín. latinoam.** 43 (4).
- Esterbauer, H (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free rad. Biol. and med.**11 (1): 81-128.
- Evelson, P (2007): Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.** 388: 261-266.
- Ferretti, G., T. Bacchetti y S. Masciangelo (2008): Lipid peroxidation in hemodialysis patients: effect of vitamin C supplementation. **Clin Biochem.** 41: 381–386.
- Folz, R. J (2007): Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 17: 393– 403.
- Fortuno, A., O. Beloqui y G. San Jose (2005): Increased phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent superoxide production in patients with early chronic kidney disease. **Kid. Internat.** 99: 71–75.
- González, Rico M, M. J.,Puchades, R. García Ramón, G. Saez, M. C. Tormos y A. Miguel (2006): Effect of oxidative stress in patients with chronic renal failure. **Nefrologia.** 26(2): 218-25.
- Gutiérrez-Salinas, J (2007): Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. **Med Int Mex.** 23: 217-22.
- Gongora, M. C., H. E. Lob y U. Landmesser (2008): Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. **Am J. Pathol.** 173: 915–926.

- Galle, J., A. Heinloth, C. Wanner y K. Heermeier (2006): Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. **Kid. Internat.** 59 (Supl. 78): 120-123.
- Goran, B., N. Dimitrinka, L. G. Lise, G. S. Rosa y G. Christian (2007): Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention. **JAMA.** 297: 842-857.
- Grahl, D. A., J. Axelsson y L. Nordfors (2007): Associations between the CYBA 242C/T and the MPO -463G/A polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular disease in chronic kidney disease patients. **Blood Purif.** 25: 210–218.
- Hicks, J. J., Y. D. Torres-Ramos y MP. Sierra-Vargas (2006): Estrés oxidante, concepto y clasificación. **Rev Endocrinol Nutr.** 14: 223-226.
- Henry, N. K y F. G. Gian (2007): Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochem. Scien.** 3: 44-50.
- Ho, Y. S., Y. Xiong y W. Ma (2006): Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **J. Biol. Chem.** 279: 32804–32812.
- Hakan, P., K. O. Mehmet, C. Ekrem, C. Yilmaz, V. Nigar y A. Ahmet (2006): Renal damage in rats induced by myocardial ischemia/reperfusion: Role of nitric oxide. **Internat. J. of Urol.** 13: 1327–1332.
- Hansson, G. K (2005): Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Eng. J. Med.** 352: 1685–1695.
- Jungers, P, Z., A. Massy y T. Nguyen-Khoa (2006): Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients: a multicentric study in the Ile de France district. **Nephrol Dial Transplant.** 14: 898-902.
- John, P., L. Fruehauf y JR. Meyskens (2007): Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? **Clin Cancer Res.** 13: 789-794.
- Jordan, P. A. y J. M. Gibbins (2006): Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. **Antiox. Redox Sig.** 8: 312–324.
- Jurek, A., B. Turyna, P. Kubit y A. Klein (2006): LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. **Clin Biochem.** 39: 19–27.

- Jackson, P., C. M. Loughrey, J. M. Lightbody, P. T. McNamee y I. S. Young (2007): Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidant in patients with chronic renal failure. **Clin. Chem.** 41: 1135-1138.
- Jung, H. H., D. H. Choi y S. H. Lee (2004): Serum malondialdehyde and coronary artery disease in haemodialysis patients. **Am J. Nephrol.** 24: 537-542.
- Kemp, M., Y. M. Go y D. P. Jones (2008): Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. **Free Radic Biol Med.** 44: 921–937.
- Kliment, C. R., J. M. Tobolewski, M. L. Manni, R. J. Tan, J. Enghild y T. D. Oury (2008): Extracellular superoxide dismutase protects against matrix degradation of heparan sulfate in the lung. **Antioxid. Redox Sig.** 10: 261–268.
- Kenji, H., N. Makiya, K. Yuki, U. Yukari, Y. Fumiyoshi y H. Mitsuru (2006): PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. **Free Rad. Biol. and Med.** 41 (9), (1): 1449-1458.
- Kinter, M., J. Wolstenholme, B. Thornhill, E. Newton, M. McCormick y R. Chevalier (2005): Unilateral ureteral obstruction impairs renal antioxidant enzyme activation during sodium depletion. **Kid. Internat.** 55: 1327- 1334.
- Karamouzis, I., P. A. Sarafidis y M. Karamouzis (2008): Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. **Am J. Nephrol.** 28: 397–404.
- Kobayashi, M., H. Sugiyama y D. H. Wang (2005): Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. **Kid. Internat.** 68: 1018–1031.
- Luke, R. G (2005): Chronic renal failure - A vasculopathic state. **N Engl J Med** 339: 841-843.
- Lu, M. y K. St. Clair. Daret (2009): Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Rad. Biol. and Medic.** 47 (4): 344-356.
- Louis-Jacques, T (1819): New Results on the Combination of Oxygen with Water. **Annales de Chimie.** 10: 335.

- Liyun, Y y K. Neil (2009): Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. **Molec. Asp. of Med.** 30 (1), (2): 29-41.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951): Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-75.
- Lahera, V., M. Goicoechea y S. G. de Vinuesa (2006): Oxidative stress in uremia: the role of anemia correction. **J Am Soc. Nephrol.** 17(Suppl 3): 174–177.
- Lee, H. S y Y. S. Kim (2006): Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsie. **Kid. Internat.** 54: 848-856.
- Maria Luisa, R. I., B. G. Cecilia, G. M. Belinda y Z. P Ana (2006): Diabetes, Estrés Oxidativo y Antioxidantes. **Investig. en Sal.** 8(1): 7-15.
- Martin, K., C. Peter, D. Luboš, M. Peter y C. Saba Biró (2006): Oxidative stress and electron spin resonante. **Clinica Chimica Acta.** 364(1-2): 61-66.
- Mc Cord, J. M. y I. Fridovich (1969): “Superoxide dismutase: an enzyme function for rythrocuprein (hemocuprein)”. **J.Biol.Chem.** 244: 6049-6055.
- Mc Cord, J.M., B. B. Keele y I. Fridovich (1974): An enzyme base theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 41: 35-97.
- Mc Intyre, M., D. F. Borh y A. F. Dominicanak (2006): Endothelial function in hypertension. The role of superoxide anion. **Hypert.** 34: 539-545.
- Makya, N., H. Mitsuru y T. Yoshinobu (2009): Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Adv. drug deliv. Resiews.** 61: 319- 326.
- Madhur, M. G y B. Anjan (2010): Human catalase: looking for complete identity. **Protein Cell.** 1(10): 888–897.
- Marcelo, G. B., G. S. Arno, S. A. Boyko y P. M Ronald (2007): Immunolocalization of hypochlorite-induced, catalase-bound free radical formation in mouse hepatocytes. **Free Rad. Biol. and Medic.** 42 (4): 530-540.
- Matriz, J. L., JR. Martín, J. P. Barrio, J. M. Culebras y P. González (2007): Experimental models on hemorrhagic shock. **Nutr. Hosp.** 22 (2):190-198.



- Marengo, B (2008): GSH loss per se does not affect neuroblastoma survival and is not genotoxic. **Internat. J. of oncol.** 32 (1): 121-127.
- Mahmut, I. Y., S. Mutlu, C. Kayser, C. Erdinc, S. Alper y O. Taner (2006): The Determinants of Endothelial Dysfunction in CKD: Oxidative Stress and Asymmetric Dimethylarginine. **Amer. J. of Kid. Dis.** 47: 42-50.
- Moreno-Manzano, V., Y. Ishikawa, J. Lucio-Czana y M. Kitamura (2005): Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of rat mesangial cells. **J. Biol. Chem.** 275: 12684-12691.
- Marklund, S y G. Marklund (1990): Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.** 47: 469-474.
- Moradi, H., M. W. Pahl, R. Elahimer y N. D. Vaziri (2009): Impaired antioxidant activity of high density lipoprotein in chronic kidney disease. **Transl Res.** 153 (2): 77-85.
- McCullough, P. A., S. Li y C. T. Jurkowitz (2008): Chronic kidney disease, prevalence of premature cardiovascular disease, and relationship to short-term mortality. **Am Heart J.** 156: 277-283.
- Nicholls, P., I. Fita y P. C. Loewen (2006): Enzymology and structure of catalases. **Adv. Inorg. Chem.** 51: 51-106.
- Nohl, H., L. Gille y K. Staniek (2005): Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Biochem. Pharm.** 69: 719-723.
- Okuno, Y., M. Matsuda y Y. Miyata (2010): Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  through a response element distinct from that of mouse. **Endocr J.** 57(4): 303-309.
- Onozato, M (2007): Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. **Kid. Internat.** 61: 186-194.
- Ottabiano, F. G., S. S. Tang, D. E. Andy y J. Loscalzo (2009): Role of peroxynitrite anion in different diseases. **Molec. and Cell. Biochem.** 327 (1), (2): 111-126.

- Prichard, S. (2006): Major and minor risk factors for cardiovascular disease in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. **Perit Dial Int.** 19(2): 133-137.
- Paul, A., H. X. Grimsrud, J. G. Timothy y AB. David (2008): Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes. **The J. of Biolog. Chem.** 283(32): 21837–21841.
- Pamplona, R (2008): Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. **Biochem. Bioph.**1777: 1249–1262.
- Peter, CL., G. K. Martin y J. H. Daniel (2007): Catalase an “old” enzyme that continues to surprise us. **ASM News.** 66: 76–82.
- Putnam, C. D., A. S. Arvai, Y. Bourne y J. A Tainer (2008): Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **J. Mol. Biol.** 296: 295–309.
- Pogan, L., L. Garneau, P. Bissonnette y R. Sauve (2007): Abnormal Calcium signaling in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats . **R. of free rad.** 19: 721-730.
- Perianayagam, M. C., O. Liangos y A. Y. Kolyada (2007): NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. **J. Am Soc. Nephrol.** 18: 255–263.
- Puchades, M. J (2009): Study of oxidative stress in advance renal disease. **Nefrol.** 29(5): 464-473.
- Ramos, L. F., A. Shintani, T. A. Ikizler y J. Himmelfarb (2008): Oxidative stress and inflammation are associated with adiposity in moderate to severe CKD. **J Am Soc Nephrol.** 19: 593–599.
- Regano, N., E. L. Iorio, A. Guglielmi, S. Mazzuoli y A. Francavilla (2008): The assessment of oxidative stress in clinical practice and its importance in nutrition. **Nut. Therapy & Metabolism.** 26(4): 149-162.
- Roob, J. M., T. Rabold y M. Hayn (2007): Ex vivo low-density lipoprotein oxidizability and in vivo lipid peroxidation in patients on CAPD. **Kid. Internat.** 59 (Supl. 78): 128-136.

- Rambod, M., C. P. Kovesdy y K. Kalantar-Zadeh (2008): Malnutrition-inflammation score for risk stratification of patients with CKD: is it the promised gold standard? **Nat. Clin. Pract. Nephrol.** 4: 354–355.
- Roob, J. M., G. Khoschsorur y A. Tiran (2000): Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. **J. Am Soc. Nephrol.** 11: 539–549.
- Sergei, K. y A. L. James (2006): Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of Escherichia coli. **J. of Bact.** 188 (17): 6326-6334.
- Schnwchenberg, Ch. G (2006) Oxigen radicals in cardiovascular-renal disease. **Current opin. in Pharm.** 2: 121-125.
- Sumner, J. B y A. L. Dounce (1937): Crystalline Catalase. **Science.** 86: 366.
- Sultana, R., M. Perluigi y D. A. Butterfield (2006): Redox proteomics identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain and in vivo and in vitro models of AD centered around Abeta (1-42). **J. Chromatogr.** 833:3-11.
- Sharma, R., A. Khanna, M. Sharma y V. Savin (2006): Transforming growth factor- $\beta$ 1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals. **Kid. Internat.** 58: 131-136.
- Sandau, K., J. Pfeilschifter y B. Brüne (2007): Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. **Kid. Internat.** 52: 378-386.
- Shah, S. V (2007): Role of iron in progressive renal disease. **Am J. Kid. Dis.** 37(Suppl 2): 30-33.
- Song, S. W., R. H. Tolba, K. Yonezawa, S. Manekeller y T. Minor (2008): Exogenous Superoxide Dismutase Prevents Peroxynitrite-Induced Apoptosis in Non-Heart-Beating Donor Livers. **Eur. Surg. Res.** 41: 353–361.
- Samouilidou, E y E. Grapsa (2003): Effect of dialysis on plasma total antioxidant capacity and lipid peroxidation products in patients with end stage renal failure. **Blood purif.** 21 (3): 209-212.
- Singh, D., R. Kaur, V. Chander y K. Chopra (2006): Antioxidants in the Prevention of Renal Disease. **J. of Medic. Food.** 9(4): 443-450.

- Terada, L. S (2006): Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. **J Cell Biol.** 174: 615–623.
- Titov, V., M. Petrenko y A. F. Vanin (2008): Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds. **Biochem.** 73: 113- 118.
- Tovbin, D., D. Mazor y M. Vorobiov (2002): Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: Role of inflammation. **Am J. Kid. Dis.** 40: 1005–1012.
- Usberti, M., G. M. Gerardi y R. M. Gazzotti (2002): Oxidative stress and cardiovascular disease in dialyzed patients. **Nephron.** 91: 25-33.
- Valco, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur y J. Telser (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Intern. J. of biochem & Cell Biol.** 39: 44-84.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic y M. Mazur (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem-Biolog Interact.** 160(1): 1-40.
- Van den Branden, C., A. Deman y B. Ceysens (2002): Vitamin E protects renal antioxidant enzymes and attenuates glomerulosclerosis in Adriamycin-treated rats. **Nephron.** 91:129–133.
- Witko-Sarsat, V., M. Friedlander y T. I. Nguyen-Khoa (2006): Advanced oxidation protein products as native mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J. Immunol.** 161: 2524-2532.
- Yu, H., J. Liu, X. Liu, T. Zang, G. Luo y J. Shen (2005): Kinetic studies on the glutathione peroxidase activity of selenium-containing glutathione transferase. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** 141: 382–389.
- Zoccali, C (2006): Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic perspective. **Kid. Internat.** 70: 26–33.
- Zager, R y K. Burkhart (2007): Myoglobin in proximal human kidney cells: roles of Fe, Ca<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a mitochondrial electron transport. **Kid. Internat.** 51: 728-738.

Zou, A. P., Y. F. Chen y Jr. A. W. Cowley (2002): Increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> counteracts the vasodilator and natriuretic effects of renal medullary infusion of TEMPOL. **FASEB J.** 16: A432. Abstract.

Zachara, B. A., J. Gromadzińska, W. Wasowicz y Z. Zbróg (2006): Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. **Acta Biochim. Pol.** 53: 663-677.

Zweier, J. L y M. A. Talukder (2006): The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. **Cardiov. Res.** 70: 181–190.

**Anexos.**

**Anexo 1**

**Planilla de Selección de Pacientes**

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Hipertenso: Si \_\_\_ No \_\_\_ Fumador: Si \_\_\_ No \_\_\_

Diagnóstico de Enfermedad Renal: \_\_\_\_\_

Tiempo de evolución de la enfermedad: \_\_\_\_\_

Tratamiento de:

Prediálisis: \_\_\_\_\_ Diálisis: \_\_\_\_\_ Hemodiálisis: \_\_\_\_\_

Tiempo de tratamiento renal sustitutivo: \_\_\_\_\_

Datos de exámenes complementarios obtenidos de las historias clínicas:

Creatinina:

Ácido Úrico:

Hierro:

Albúmina:

Colesterol:

Triacilglicéridos:

VLDL:

## **Anexo 2**

### **Consentimiento informado**

Esta investigación tiene como objetivo determinar parámetros de estrés oxidativo en pacientes con Enfermedades Renales Crónica (en estadios de prediálisis y hemodiálisis) lo cual aportará información para el sector de la salud, para contribuir en la labor preventiva y utilización de una terapia fármaco-dietética que permita una mejor calidad de vida al individuo.

Por tanto hago constar, por este medio, mi consentimiento voluntario para ser incluido(a) en la investigación antes mencionada. Comprendo que me beneficio al tener un amplio conocimiento sobre mi estado de salud actual y me han explicado los riesgos, los cuales son, prácticamente nulos.

Los resultados me serán comunicados, de forma individual, al finalizar el estudio. Conozco y he comprendido claramente sus objetivos, declaro que he tenido la oportunidad de aclarar todas mis dudas respecto a esta investigación y que el médico evaluador me ha considerado apto para involucrarme en la misma. Se me ha explicado que esta aprobación es totalmente voluntaria y no representa ningún compromiso, pues estoy en plena libertad de no aceptarla o retirarla cuando lo estime conveniente. Se me deja constancia para la posible localización de los investigadores en caso de que me surjan preocupaciones.

**Nombre y Apellidos del médico que informó:** \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Nombre y Apellidos del paciente:** \_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_