

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ESTRÉS OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS EN ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO
CARDIOVASCULAR : ESTUDIO ESPECIAL DE LA
HIPERTENSIÓN ARTERIAL

OLGA ESPINOSA IBÁÑEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 d'
Abril de 2007 davant un tribunal format per:

- D. José Cabo Soler
- D^a. Ana Linares Gil
- D. Pedro Puig Parellada
- D. Josep Redon i Mas
- D. Antonio Iradi Casal

Va ser dirigida per:

D. Guillermo Sáez Tormos

©Copyright: Servei de Publicacions
Olga Espinosa Ibáñez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6937-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT (U*) ID VALENCIA Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Secció Departamental de Medicina i Odontologia

ESTRÉS OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS EN ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR: ESTUDIO ESPECIAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.



TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR: OLGA ESPINOSA IBÁÑEZ.

DIRIGIDA POR: GUILLERMO SÁEZ TORMO.

JAVIER CHAVES MARTÍNEZ

A Gloria y Manolo, a mis padres.

Esta es sin duda la parte más dulce de escribir, y a la que más vueltas le estoy dando, porque no me perdonaría quedarme corta en los agradecimientos teniendo tantísimo que agradecer.

Gracias al Dr. Guillermo Sáez por abrirme las puertas de su laboratorio y su grupo de investigación, su apoyo incondicional, su paciencia, su confianza y por ser tan buen comunicador de conocimientos.

Gracias al Dr. Javier Chaves por brindarme la oportunidad de poder trabajar junto a tan buenos profesionales en este periodo de formación.

Gracias al Dr. Josep Redón por su imprescindible colaboración en la recogida de muestras de esta investigación y por su labor de coordinación.

No puedo olvidarme de dar las gracias en este punto al Dr. Enrique Montero al que le agradeceré de por vida el interés y empeño que hace casi 10 años le puso en despertarme el gusanillo por la investigación y por su ayuda y sus consejos durante todos estos años.

Gracias a todos mis compañer@s de los 2 laboratorios Jorge, M^a Carmen, Susana, Carla, Sonia Clapés, Vero, M^a Luisa, Ana Barbara y

Tani por el aprendizaje compartido, los retos superados, las risas y los buenos ratos.

Gracias a estos 4 años de suerte que han hecho mella en mi vida por haber conocido a personas tan cruciales y especiales; Corcho, gracias por pintar mi vida de colores, por tu amistad, tu complicidad y por tanto amor. Jose, gracias por ser un ángel, mi ángel. Lili, Carlos, Cora, Ale, Lucía, David, Ani, Seba, Rubén, Jorge, Carla y Sonia gracias por todo lo vivido, por sentirnos siempre cerca, por el privilegio de disfrutaros y por ser parte de mi vida.

Gracias a mi familia, a mi padre, a mi hermano Víctor, mis sobrinos Alejandro y Haydeé (que lindo es veros crecer!) por su apoyo, su amor incondicional y por la felicidad de volver a vivir juntos.

Gracias a toda mi gente de Graná, a mis niñas: Monica, Caro, Inma, M^a Paz, Laura, Loli, Ana, Nina, Elenita y Susi, a mis niños: Moi, Juanma, Enrique y Quirri, a mis prim@s: Marina, Oscar, Arse, Vanesa, Marita y Raquel. A tod@s vosotr@s gracias por ser tan lind@s, por echaros tanto de menos en este tiempo y por hacerme saber que era recíproco.

Gracias a mi madre por su ejemplo y su energía.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

·OH: radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno
8-OH-Gua: 8 hidroxiguanina
8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADP: adenosíndifosfato
AGL: ácidos grasos libres
Ang-II: angiotensina II
ARN: ácido desoxirribonucleico
ATP: adenosín trifosfato.
BC: batocuprina
BER: base excisión reparación
BH₄: tetrahidrobiopterina.
BSA: suero de albúmina bovina
CAT: catalasa
CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol
DBP: presión sanguínea diastólica
DE: disfunción endotelial.
DHAA: radical deshidroascorbato
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2.
DNP: dinitrofenilhidrazina
DTNB : 2-ácido nitrobenzoico
EDRF: factor relajante derivado del endotelio
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.
EO: Estrés Oxidativo.
ERN: especies reactivas del nitrógeno.
ET-1: endotelina 1.
FAD: flavin adenin dinucleótido
FMN: flavin mononucleótido
G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenada
GPx: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno
H₂O: agua
HDL: lipoproteínas de alta densidad
HF: Hipercolesterolemia Familiar.
HFC: Hiperlipemia Familiar Combinada.
hMTH1: 8-oxod-GTPasa
HNO₂: ácido nitroso
HO₂: dióxido de hidrógeno
HOCl: ácido hipocloroso
HPLC: cromatógrafo líquido de alta eficacia
HRP: peroxidasa de rábano
HTA: Hipertensión Arterial Esencial.
ICAM-I: molécula de adhesión a monocitos.
ICAM-I: moléculas de adhesión intercelular
IDL: lipoproteína de densidad intermedia
IL-6: interleucina 6
IRS- 1: sustrato del receptor de insulina
LDL: lipoproteínas de baja densidad.
LOX: lipooxigenasa
MAP kinasas: kinasas de proteínas mitogénicas activadas
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos
MCP-I: factor quimiotáctico de la pared vascular.
MCSF: factor quimiotáctico de la pared vascular.
MDA: malondialdehído
N₂O₃: trióxido de dinitrógeno
N₂O₄: tetróxido de dinitrógeno
NADH: nicotinamin adenindinucleótido
NAPDH oxidasa: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidasa.
NER: nucleótido excisión reparación
NFkB: factor nuclear kB
NO⁻: anión nitroxilo
NO: óxido nítrico.
NO⁺: catión nitroxilo
NO₂: dióxido de nitrógeno
NO₂⁺: catión nitronio
O₂: oxígeno molecular.

O_2^- : radical superóxido.
OGG1: 8-oxoguanina glicosilasa 1
OH⁻: ión hidroxilo
ONOOH: ácido peroxinitroso.
OONO⁻: peroxinitrito.
PAI 1: inhibidor del activador del plasminógeno 1
PAO: poder antioxidante global
PCR: proteína C reactiva
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
pNPP: p-nitrofenil fosfato
RO[•]: radical alcoxilo
RONOO: alquilperoxinitrito
ROO[•]: radical peroxilo
ROOH: hidropéroxido lipídico
ROS: Especies Reactivas del Oxígeno.
rpm: revoluciones por minuto
RSO[•]: radical oxisulfuro
RT-PCR: retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa
SBP: presión sanguínea sistólica
SM: Síndrome Metabólico.
SOD: superóxido dismutasa
TG: triglicéridos
TNB: 5'-ácido tionitrobenzoico
TNF α : factor de necrosis tumoral
Trx: tiorredoxina
TrxR: tiorredoxina reductasa
UEA: excreción urinaria de albúmina
VCAM-I: molécula de adhesión de células vasculares
XDH: xantina deshidrogenada
XO: xantina oxidasa.

ÍNDICE

I : Introducción

| | |
|---|-----|
| 1 . Antecedentes..... | 23 |
| 2 . Enfermedades cardiovasculares y disfunción endotelial | 26 |
| 2.1: Disfunción endotelial..... | 26 |
| 2.2: Formación de la placa aterogénica..... | 30 |
| 3 . Metabolismo Oxidativo..... | 34 |
| 3.1: Evolución celular: la vida con oxígeno..... | 34 |
| 3.2: Radical libre y especies reactivas del oxígeno..... | 36 |
| 3.3: Tipos de especies reactivas del oxígeno (ROS)..... | 39 |
| 3.3.1: Radicales libres del oxígeno molecular..... | 40 |
| 3.3.2: Especies reactivas del oxígeno no radicales... | 47 |
| 3.4: Génesis de especies reactivas del oxígeno..... | 50 |
| 3.4.1: Fuentes endógenas de ROS..... | 52 |
| 3.4.2: Fuentes exógenas de ROS..... | 61 |
| 3.5: Sistemas defensivo antioxidante..... | 62 |
| 3.5.1: Defensas primarias endógenas..... | 65 |
| 3.5.1.1: Antioxidantes enzimáticos..... | 65 |
| 3.5.1.2: Antioxidantes no enzimáticos..... | 75 |
| 3.5.2: Defensas exógenas primarias..... | 77 |
| 3.5.3: Defensas secundarias..... | 81 |
| 3.6: Acciones de las especies reactivas del oxígeno..... | 84 |
| 3.6.1: Sobre lípidos..... | 87 |
| 3.6.2: Sobre proteínas..... | 89 |
| 3.6.3: Sobre carbohidratos..... | 91 |
| 3.6.4: Sobre el ADN..... | 92 |
| 4 . Especies reactivas del oxígeno y pared vascular..... | 95 |
| 5 . Factores de riesgo en la aterosclerosis..... | 100 |
| 5.1: Factores de riesgo modificables..... | 102 |
| 5.1.1: Hipertensión Arterial Esencial..... | 102 |
| 5.1.2: Síndrome Metabólico..... | 104 |
| 5.1.3: Trastornos del metabolismo lipídico..... | 111 |
| 5.1.3.1: Hipercolesterolemia familiar (HF)..... | 112 |
| 5.1.3.2: Hiperlipemia Fam. Combinada (HFC)..... | 113 |

| | |
|---|------------|
| II : Hipótesis de trabajo y Objetivos..... | 117 |
| III : Pacientes..... | 123 |
| 1. Reclutamiento de pacientes y controles..... | 123 |
| 2. Selección de pacientes y controles..... | 123 |
| 3. Estudio general de los pacientes..... | 125 |
| 4. Estudio del grupo control..... | 125 |
| 5. Aparatos..... | 126 |
| IV : Metodología..... | 128 |
| 1. Extracción de sangre, aislamiento de linfocitos, ADN y ARN..... | 128 |
| 2. Estudio de los niveles de estrés oxidativo..... | 130 |
| 2.1: Parámetros de estudio..... | 130 |
| 2.1.1: Determinación de los productos de oxidación | 131 |
| 2.1.1.1: Determinación de GSH, GSSG y MDA | 131 |
| 2.1.1.2: Determinación de 8-oxo-dG nuclear, mitocondrial y urinaria..... | 132 |
| 2.1.1.3: Determinación proteínas carboniladas... | 135 |
| 2.1.1.4: Determinación de PAO..... | 136 |
| 2.1.1.5: Determinación de NO ₃ /NO ₂ | 137 |
| 2.1.2: Determinación de actividades enzimáticas... | 138 |
| 2.1.2.1: Determinación de SOD..... | 138 |
| 2.1.2.2: Determinación de Catalasa..... | 140 |
| 2.1.2.3: Determinación de GPx..... | 141 |
| 2.1.2.4: Determinación de GSR..... | 142 |
| 2.1.2.5: Determinación de Tiorredoxina..... | 143 |
| 2.1.2.6: Determinación de XO..... | 145 |
| 3. Estudio genético..... | 146 |
| 3.1. Estudio de los niveles de ARNm de los genes implicados en la defensa antioxidante y la reparación del daño oxidativo al ADN..... | 146 |
| 4. Metodología estadística y soporte informático..... | 151 |
| V: Resultados..... | 155 |

| | |
|---|-----|
| 1. <i>Análisis del grupo control y los pacientes de HTA.</i> | |
| <i>Evaluación de la asociación con el síndrome metabólico.....</i> | 155 |
| 1.1: <i>Características generales de la población de estudio.....</i> | 155 |
| 1.2: <i>Estudio de los productos de oxidación, marcadores de EO y metabolitos relacionados.....</i> | 158 |
| 1.2.1: <i>Valoración de la liberación de la 8-oxo-dG en orina y correlación con otros metabolitos del EO.....</i> | 165 |
| 1.2.2: <i>Correlación de la microalbuminuria con los metabolitos del EO.....</i> | 169 |
| 1.2.3: <i>Análisis por rango de edades de los parámetros de EO y metabolitos relacionados.....</i> | 170 |
| 1.3: <i>Determinación de la actividad de los principales sistemas antioxidantes y oxidante.....</i> | 171 |
| 1.4: <i>Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes seleccionados.....</i> | 174 |
| 2. <i>Estudio comparativo del grado de estrés oxidativo entre el grupo control y los tres grupos patológicos de alto riesgo cardiovascular.....</i> | 177 |
| 2.1: <i>Características generales de la población de estudio.....</i> | 177 |
| 2.2: <i>Estudio de los productos de oxidación, marcadores de EO y metabolitos relacionados.....</i> | 179 |
| 2.2.1: <i>Correlación de los niveles de colesterol total y de glucosa basal con los metabolitos del EO.....</i> | 184 |
| 2.3: <i>Determinación de la actividad de los principales sistemas antioxidantes y oxidantes.....</i> | 185 |
| 2.4: <i>Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes seleccionados.....</i> | 187 |
| 3. <i>Síntesis comparativa de los resultados obtenidos.....</i> | 191 |
| | |
| VI: <i>Discusión</i> | 197 |
| VII: <i>Conclusiones</i>..... | 217 |
| VIII: <i>Bibliografía</i>..... | 223 |

ESTRÉS OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS EN ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR: ESTUDIO ESPECIAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.

1. ANTECEDENTES.

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en las sociedades occidentales, suponiendo en España el 44% de la mortalidad en adultos y siendo en Europa 4 los millones de personas que mueren cada año a causa de éstas o sus complicaciones.

El riesgo de desarrollar esta enfermedad no es homogéneo en toda la población y depende de numerosos factores; la enfermedad cardiovascular es uno de los modelos de enfermedad multifactorial donde confluyen tanto factores ambientales como genéticos, muchos de ellos desconocidos hasta el momento. Uno de los principales factores de riesgo es la presencia de determinados hábitos como el tabaquismo (28% de la población) y el desarrollo de una serie de enfermedades frecuentes en la población como son la hipertensión arterial esencial o HTA(20%), dislipemias (30%), síndrome metabólico o SM(10%), diabetes mellitas tipo 2 o DM2(6%).

Sin embargo, los factores de riesgo cardiovascular "conocidos" sólo explican la mitad del riesgo asociado a esta patología (Lefkowitz and Willerson 2001) por lo que se justifica que en los últimos años se hayan intensificado los esfuerzos encaminados a descubrir nuevos factores de

riesgo cardiovascular, sus mecanismos de actuación intermedios y los tratamientos que intenten reducirlos.

Una característica común de estas enfermedades es la existencia de un aumento del estrés oxidativo (EO) (Cai and Harrison 2000) con respecto a individuos sanos. Se sabe que algunos productos de oxidación son aterogénicos y otros se han relacionado con un mayor riesgo cardiovascular. Es importante dilucidar el papel de las moléculas productoras de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la respuesta metabólica y molecular de las células circulantes en los pacientes de las patologías que vamos a estudiar (Hipertensión Arterial Esencial, HTA y Dislipemias; Hiperlipemia Familiar Combinada, HFC e Hipercolesterolemia Familiar, HF), y su repercusión a nivel del endotelio vascular; esta cuestión es importante ya que el mismo estrés oxidativo y las moléculas oxidadas que origina, tienen como consecuencia, una serie de respuestas celulares y sistémicas, mediadas por diferentes factores y moléculas que actúan como reguladoras y/o señalizadoras, imprescindibles para el correcto funcionamiento celular (Lander 1997) y que pueden desencadenar o ayudar en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en determinados pacientes; el nivel de expresión de los numerosos genes que componen la defensa celular y orgánica frente a dicho estrés, pueden estar determinando la respuesta al estrés oxidativo en estas enfermedades y, por tanto, la posibilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular.

Estudios previos de nuestro grupo confirman que los pacientes de HTAe poseen un aumento significativo de los marcadores de EO así como una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes que le protegen frente a este (Redon 2003). Está demostrado que la reducción de las cifras tensionales de estos pacientes conlleva una disminución de los productos de oxidación, así como una mejora en sus actividades antioxidantes (Sáez 2004).

Resulta interesante para este estudio, comparar los niveles de EO en las diferentes patologías cardiovasculares seleccionadas, midiendo la respuesta de las células mononucleares frente al EO crónico a través de la medida de los niveles de ARNm de las actividades antioxidantes en cada una de ellas. Así podremos analizar la respuesta de las células mononucleares y la sangre de los pacientes seleccionados frente al EO crónico que presentan dichas patologías.

2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La disfunción endotelial (DE) es un importante y temprano evento en la patogénesis de la aterosclerosis, que contribuye a la iniciación y progresión de la placa aterosclerótica, lo cuál se asocia a cambios bioquímico-morfológicos que gradualmente transforman la estructura de la pared arterial.

Considerado durante mucho tiempo el endotelio como una simple membrana semipermeable, en los últimos 30 años se ha ganado el título de órgano complejo que controla la homeostasis vascular por integración de señales entre la pared vascular y la luz del vaso y la sangre, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de un tono vascular normal así como de la fluidez sanguínea, la activación plaquetaria y la adhesión de leucocitos, así como limitando las reacciones inflamatorias vasculares (Gimbrone 1995).

Debido a la importancia que toma el endotelio vascular en esta investigación se hace imprescindible centrarnos en su fisiología y funcionamiento para ver como se ve afectado en las diferentes patologías seleccionadas para esta investigación.

2.1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

El endotelio vascular es una monocapa de células que está estratégicamente localizada sobre la superficie interna de todos los

vasos sanguíneos, formando una estructura vital y dinámica, que tiene una función crucial en condiciones tanto fisiológicas como patológicas. Las células endoteliales son expuestas continuamente a todos los componentes de la circulación sanguínea y dichas células, sensibles a estímulos mecánicos como la presión sanguínea, hormonales o ante moléculas vasoactivas, son capaces de responder liberando sustancias que regulan la función vasomotor, disparan procesos inflamatorios y afectan a la homeostasis (Endemann 1983-1992, 2004). Posee una importante función metabólica con respecto a sustancias vasoactivas: secreta sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO), prostaciclina, factores de crecimiento en respuesta al daño, tanto a la pared vascular como al torrente sanguíneo, modulando entre otros factores la estructura y funcionalidad del músculo liso vascular. De la misma manera, el endotelio también secreta sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-I (ET-1), angiotensina II (Ang-II), tromboxano A₂ y las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Endemann 1983-1992, 2004; Verma 2002).

Esto sitúa al endotelio en una posición única como órgano endocrino, paracrino e incluso autocrino, con múltiples funciones. Por lo tanto, además de su misión como una barrera física permeable, su importancia radica en el gran número de funciones que regula (Inagami 1995). Una de ellas es el transporte capilar selectivo, permitiendo o facilitando el paso de determinadas sustancias e impidiendo el paso de otras contenidas en

la sangre. Regula también los lípidos plasmáticos: metabolismo de lipoproteínas, control del exceso de colesterol, etc.

Tiene propiedades antitrombóticas que inhiben la adhesión de plaquetas, eritrocitos y leucocitos a la pared vascular; por lo tanto las células endoteliales son cruciales en el mantenimiento del flujo sanguíneo laminar. La alteración del endotelio afecta a la fibrinólisis acelerando la coagulación intravascular (Haller 1997).

Posee una importante función metabólica con respecto a sustancias vasoactivas: secreta sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO), prostaciclina, factores de crecimiento en respuesta al daño, tanto a la pared vascular como al torrente sanguíneo, modulando entre otros factores la estructura y funcionalidad del músculo liso vascular. De la misma manera, el endotelio también secreta sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-I (ET-1), angiotensina II (Ang-II), tromboxano A₂ y las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Endemann 1983-1992, 2004; Verma 2002).

En condiciones normales, la regulación de la homeostasis vascular y la modulación inflamatoria se regulan por la elaboración de unos factores que actúan localmente en la pared del vaso sanguíneo y el lumen, como son el NO, prostaciclina y endotelina-I. Sin embargo, en situaciones concretas el endotelio puede además modificar su fenotipo facilitando su vasoconstricción, inflamación y la aparición de eventos trombóticos. Este tipo de respuestas anormales se manifiestan en condiciones patológicas como la Hipertensión Arterial, Hipercolesterolemia o Diabetes Mellitus,

y ocurren en ausencia de cambios morfológicos en los vasos (Drexler 1997). Interesantemente, evidentes coherencias sugieren que dichas patologías aumentan el riesgo de sufrir aterosclerosis y son predictoras de futuros eventos cardiovasculares (Halcox 2002). La etiología de esta alteración de la función endotelial es multifactorial y los mecanismos que la causan son complejos y todavía no están completamente claros. Entre estos factores encontramos alterados los receptores de señalización debido a los cambios de membrana, alteraciones en la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), disminución de la biodisponibilidad de la tetrahidrobiopterina (BH₄) que es cofactor enzimático de la eNOS, así como incremento en la generación de radical superóxido (O₂⁻); todos estos factores son considerados responsables de estas alteraciones vasculares (Gokce 1998). Sin embargo, la mayor parte de los mecanismos propuestos implicados en la patogénesis de la disfunción endotelial está relacionado con el aumento en la producción de ROS ; los ROS podrían reducir la biodisponibilidad de NO y exacerbar el EO local por medio de reacciones directas con el NO para formar peroxinitrito (OONO[•]), el cuál, en ataque, podría fomentar el daño oxidativo al endotelio (Cai and Harrison 2000).

Una vez vista la multifuncionalidad y la fragilidad del endotelio vascular ante las diversas agresiones que puede sufrir, vemos a continuación el siguiente paso en el proceso aterosclerótico, la formación de la placa de ateroma.

2.2. FORMACIÓN DE LA PLACA ATEROGÉNICA.

El primer paso en el proceso de la aterosclerosis, como acabamos de ver, es la disfunción endotelial, que facilita el paso de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), ricas en colesterol, al espacio subendotelial. Allí se unen a constituyentes de la matriz extracelular, como el heparán sulfato, aumentando su tiempo de residencia. Estas lipoproteínas, secuestradas en el espacio subendotelial y lejos de los antioxidantes del plasma, van a ser oxidadas por los radicales libres derivados del metabolismo celular. Las LDL oxidadas van a promover en la superficie de las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión a monocitos, como la VCAM-I, la ICAM-I, la P-selectina, etc. La molécula 1 de adhesión vascular-celular (VCAM-1) se expresa en respuesta a la hipercolesterolemia, de manera que los monocitos y los linfocitos portadores de contrarreceptores para la VCAM-I se adhieren a estos sitios.

Una vez que linfocitos y monocitos se adhieren a la superficie endotelial son atraídos al espacio subendotelial por factores quimiotácticos como el MCP-I o el MCSF, ambos producidos en la pared vascular por el estímulo de las LDL oxidadas. Ya en el interior de la pared los monocitos se diferencian en macrófagos que actúan como primera línea de defensa contra las LDL oxidadas fagocitándolas a través de sus receptores eliminadores (scavenger) y acumulándolas en su citoplasma, dando lugar a su transformación en células espumosas (Fig 1).

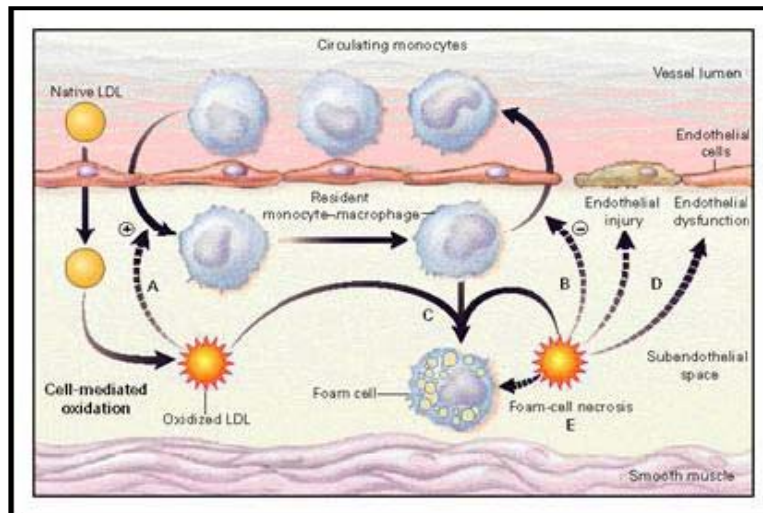


Fig 1: Aterogénesis : Proceso inflamatorio (Epstein 1999).

Algunas de ellas van a morir liberando gran cantidad de productos tóxicos (LDL oxidadas, radicales libres, enzimas, etc) que van a producir un nuevo daño endotelial directo y a autoperpetuar el proceso. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) actúan como una segunda línea de defensa contra la acumulación lipídica en la pared vascular, reduciendo el número de partículas de LDL de la pared vascular y disminuyendo la oxidación de las mismas.

Las células implicadas en la inflamación de la aterosclerosis son los monocitos circulantes (que han pasado a ser macrófagos en el interior de la pared arterial) y los linfocitos. La importancia del estudio de dichas células es doble, ya que son productoras de EO y al mismo tiempo interaccionan con la pared vascular. Actualmente se sabe que hasta un

20% de las células en algunas zonas de las placas ateroscleróticas son linfocitos T de origen policlonal, que reaccionan contra las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. La asociación de valores elevados de anticuerpos circulantes contra la LDL oxidada sugiere que los linfocitos B también están implicados en la patogenia inflamatoria de la aterosclerosis (Nicoletti, 1999). Debido a que las principales células implicadas en el ateroma son las mononucleares (linfocitos y monocitos) centramos esta investigación en el aislamiento y análisis de éste tipo celular.

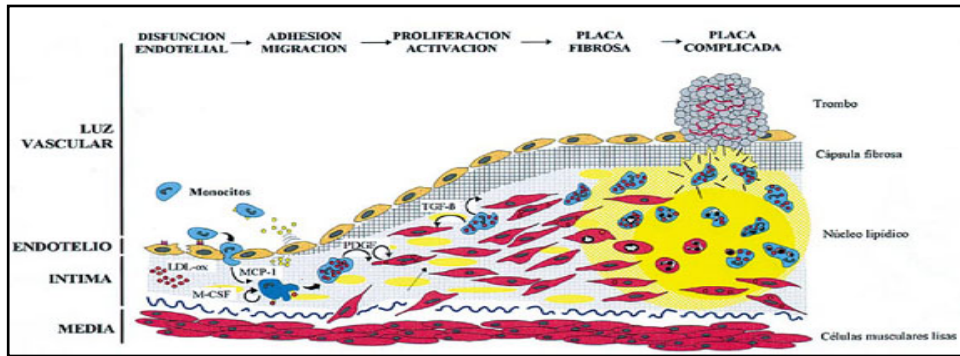
Cuando el daño endotelial permite el contacto del tejido subendotelial con las plaquetas, éstas, junto con las células endoteliales y los macrófagos, liberan PDGF, favoreciendo la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de matriz extracelular por parte de dichas células, engrosando así la placa.

El daño endotelial va a llevar a una disminución de la producción de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico o la prostaciclina, y a un aumento de la producción de sustancias constrictoras, como la endotelina-I, alterando el tono vascular y favoreciendo la vasoconstricción local.

Por todo lo expuesto hasta ahora puede formarse una placa de ateroma que estenosará parcialmente la luz arterial, pero que no dará

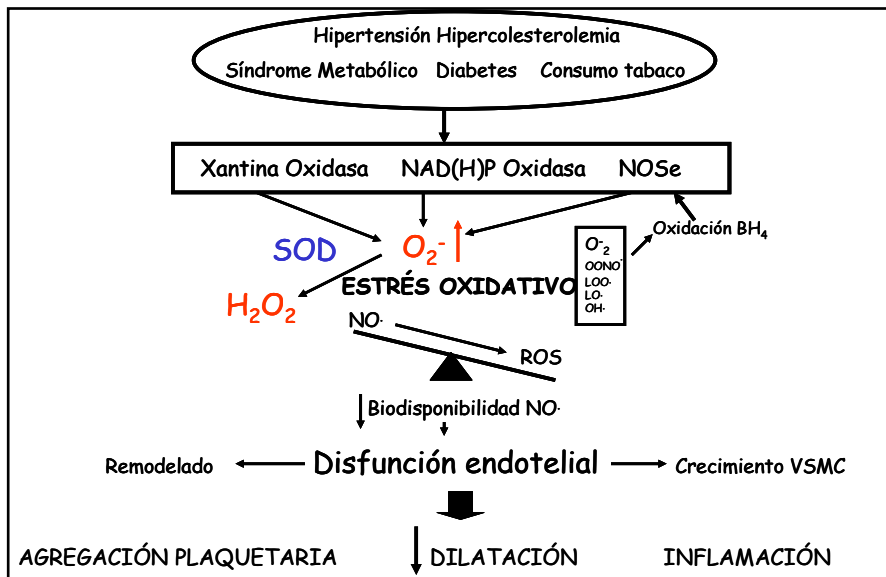
manifestaciones clínicas hasta que se rompa y se forme un trombo, el cuál podrá ocluir la luz arterial de forma completa o podrá aumentar el grado de estenosis (Fig 2) (2003).

Fig 2: Formación de la placa aterosclerótica (Revista Clínica Española).



En la Fig 3 se muestran los posibles riesgos cardiovasculares que se presentan en las distintas patologías que vamos analizar.

Fig 3: Riesgo cardiovascular asociado a las patologías sometidas a estudio.



Una vez vistas las posibles consecuencias cardiovasculares a las que están expuestos los pacientes de las patologías seleccionadas para este estudio, vamos a analizar detenidamente la implicación del estrés oxidativo en la evolución de los trastornos cardiovasculares, ya que constituye un objetivo prioritario en esta investigación.

3. METABOLISMO OXIDATIVO.

3.1. EVOLUCIÓN CELULAR: LA VIDA CON OXÍGENO.

Las células primitivas, llamadas anaerobias estrictas, viven de la fermentación, absorbiendo compuestos orgánicos y generando ATP (adenosintrifostato) anaeróbicamente. Es razonable suponer, por lo tanto, que evolucionaron en ausencia de oxígeno.

A medida que las reservas de compuestos orgánicos se fueron reduciendo con el tiempo, se produjo la evolución del aparato fotosintético, que permitió a las células manufacturar los compuestos orgánicos que necesitaban a partir de compuestos inorgánicos, utilizando la luz como fuente de energía . Sin embargo, los primeros fotosintetizadores fueron también bacterias anaeróbicas y su primitiva forma de fotosíntesis no generó oxígeno.

Las células fotosintéticas, derivadas de las anaerobias estrictas, desarrollaron un nuevo tipo de fotosíntesis que les permitió obtener el hidrógeno de las moléculas de agua eliminando oxígeno como producto residual; esto ocurrió hace unos 2500 millones de años con la

proliferación de las cianobacterias (los primeros organismos que liberaron oxígeno como producto residual de la fotosíntesis). Así, el oxígeno comenzó gradualmente a acumularse en el agua, suelos, sedimentos y en la atmósfera: la era aeróbica estaba comenzando.

El oxígeno es un gas tóxico y reactivo, capaz de oxidar los compuestos del carbono. Al ser el oxígeno tóxico para la vida primitiva, se fue convirtiendo en un agente contaminante cada vez más peligroso, llegando a constituir una amenaza para su propio productor, las cianobacterias. Muchos organismos, incapaces de tolerar este gas, tuvieron que refugiarse en nichos aeróbicos, o extinguirse (Margulis 1986).

Por otro lado, forzó en un estadio temprano a otro grupo de células, a desarrollar mecanismos para su detoxificación intracelular, en los que se encuentran implicadas enzimas tales como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, que reaccionan con los radicales tóxicos producidos por el oxígeno y los convierten en compuestos orgánicos inocuos y agua. La evolución de estos enzimas protectores permitió que las células toleraran la presencia del oxígeno.

Pronto, sin embargo, los microorganismos hallaron una solución a la problemática del oxígeno, desarrollando la capacidad de usarlo mediante la respiración. Ésta solución no sólo les protegió, sino que además les aportó una energía adicional, porque la respiración genera más ATP que la fermentación. Sin embargo, muchos de los productos que se originan durante la respiración celular son por naturaleza potentes oxidantes para otras moléculas, por lo que las células aerobias tienen que pagar un precio

inevitable, y es la toxicidad de las ROS de las que se han de defender (Fridovich 1978).

3.2. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).

Los electrones de los átomos ocupan regiones espaciales conocidas como orbitales. La estructura de un átomo o una molécula es termodinámicamente más estable si en cada orbital hay un máximo de dos electrones, que giran en direcciones opuestas, o sea, se hallan apareados. Un electrón no apareado es el que está solo en un orbital, con dos posibles direcciones de giro. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen sólo electrones apareados y suelen ser, por lo tanto, químicamente estables.

Los radicales libres son especies químicas (átomos o moléculas) que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, y pueden tener carga (positiva o negativa) o no.

Esta propiedad de tener electrones desapareados le puede conferir al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a interactuar rápidamente con otros átomos o moléculas (radicales o no) con las que entren en contacto, tendiendo a ceder este electrón extra para estabilizar su orbital de valencia (radical reductor), a aceptar un electrón para estabilizar el electrón desapareado (radical oxidante), o a unirse a un no radical, en cuyo caso, este último se convierte en un radical

libre. Mediante estos mecanismos los radicales libres dan lugar a reacciones en cascada con formación de nuevos radicales libres. Sólo cuando coinciden dos radicales pueden combinar sus electrones desapareados y unirse mediante un enlace covalente, terminando así con dichas reacciones, aunque pueden existir de manera estable compuestos en forma de radical libre (Marquina 2000).

Los radicales libres son generados in vivo como productos del metabolismo normal, teniendo en cuenta que cada célula humana metaboliza 10^{12} moléculas de oxígeno por día (Floid 1995; Jackson 2001). En el organismo pueden crearse intra y extracelularmente, mediante mecanismos en los que están implicados numerosos enzimas y tipos celulares. En condiciones normales, la inmensa mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno (Halliwell 1991).

El radical más abundante en los sistemas biológicos es el oxígeno molecular. Su capacidad oxidante y la reactividad de las especies químicas generadas en su reducción vienen determinadas por sus estructuras electrónicas moleculares. En 1924 se estableció que el oxígeno molecular (O_2) es un diradical ($\uparrow \cdot \underline{\underline{O}} - \underline{\underline{O}} \cdot \uparrow$) que posee dos electrones desapareados en su orbital más externo con giros paralelos. Esta disposición de los giros previene la adición directa de un par de electrones (para lo cual debería haber un giro paralelo y otro

antiparalelo) a la molécula, necesitando una inversión del giro antes de que se pueda producir la unión, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli*, para evitar la colocación de dos giros electrónicos paralelos en el mismo orbital. Ya que el proceso de inversión del giro es lento comparado con la vida media de los elementos en colisión, el resultado es que el oxígeno en su estado fundamental es un oxidante relativamente débil, permitiendo la coexistencia de materia orgánica y oxígeno libre. En la figura 4 podemos ver los diferentes estados energéticos del oxígeno molecular.

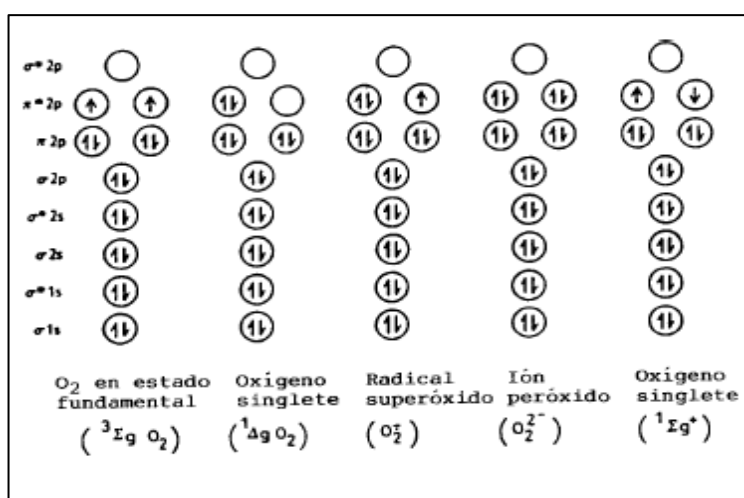
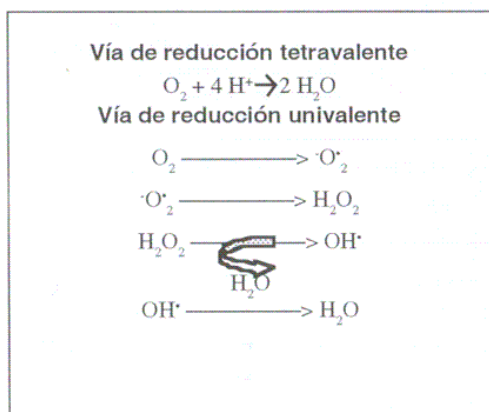


Fig 4: Estados energéticos del oxígeno molecular.

* Principio de exclusión de Pauli: en un mismo átomo o sistema orbital, no pueden existir dos electrones con valores iguales en sus cuatro números cuánticos; deben diferir en al menos uno. Eso significa que ningún orbital puede contener más de dos electrones y que estos deben tener sus respectivos giros apareados, o sea, orientados en sentidos opuestos (Marquina, E. (2000). Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas. Valencia, Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.

Una consecuencia de esta restricción del giro, es que el estado fundamental del oxígeno favorecerá la vía de reducción univalente del mismo, siempre que sea posible energéticamente y como muestra la Fig 5 (Barquinero 1992).

Fig 5: Vías de reducción del oxígeno molecular.



Frecuentemente se utiliza de manera equivocada el término "radicales libres del oxígeno", asignándosele a todas las especies reactivas del oxígeno intermedias, incluidas aquellas formas moleculares que no son radicales. Es más apropiado hablar de especies reactivas del oxígeno en lugar de radicales libres del oxígeno, aunque esta denominación también podría matizarse, ya que como está expuesto más adelante, existen especies con una muy alta y otras con menor reactividad.

3.3. TIPOS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS).

Como se ha comentado previamente, el término especies reactivas de oxígeno se utiliza para designar de modo colectivo tanto a los radicales

de oxígeno (superóxido, hidroxilo) como a las especies no radicales, que se comportan como oxidantes, particularmente el peróxido de hidrógeno, el oxígeno molecular "singlete" y el ácido hipocloroso.

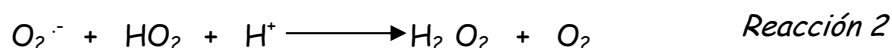
3.3.1: RADICALES LIBRES DEL OXÍGENO MOLECULAR.

Radical superóxido o dióxido(1-) ($O_2^{\cdot -}$) (Fridovich 1978; Fridovich 1983; McCord 1983)

El anión superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) con el cual se equilibra. Ya que el pK_a para la reacción de disociación es 4,88, hay poco radical hidroperoxilo a valores fisiológicos de pH (Halliwell 1980). Sin embargo, a pH bajos la concentración de radical hidroperoxilo puede aumentar extraordinariamente (ej: tejidos isquémicos, superficie de macrófagos activados,...) (Halliwell 1984; Granger 1994).



Ambos pueden reaccionar produciéndose la siguiente reacción de dismutación, originando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno ($k^* = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Halliwell 1980).



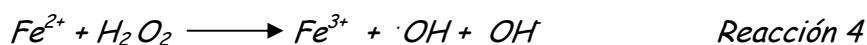
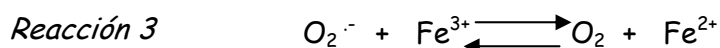
k^* : Constante de velocidad o velocidad de reacción específica

Es el único radical a través del cual se pueden formar la mayoría de las especies reactivas del oxígeno (reacciones 1, 2, 5, la de Haber-Weiss y la reacción de Fenton).

En la reacción de Haber-Weiss se pueden producir un radical hidroxilo y el ión hidroxilo por la interacción del radical superóxido con el peróxido de hidrógeno.

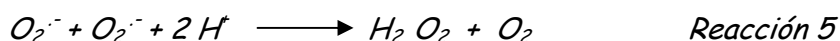


Se asume que la reacción de Haber-Weiss en solución acuosa, se produce a una velocidad demasiado lenta a bajas concentraciones de radical superóxido y peróxido de hidrógeno para tener una significación fisiológica, aunque termodinámicamente es posible (Halliwell 1980). La reacción se acelera por la presencia de metales de transición, algo que ya sugirieron Haber y Weiss (Haber 1934), particularmente el hierro que actuaría como catalizador (McCord 1978; Halliwell 1980). Así, el radical superóxido reduce el hierro (reacción 3) el cual a su vez reduce el peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo, es la reacción que describió Fenton en 1894 (reacción 4) (McCord 1978; Gutteridge 1983; Halliwell 1984).



Como normalmente la concentración de oxígeno es mayor que la de radical superóxido, se favorece la reacción de oxidación de Fe^{2+} (reacción 3). Si la concentración intracelular de superóxido es mayor que la de oxígeno se reducirá el Fe^{3+} a Fe^{2+} , favoreciéndose la reacción de Fenton (Nappi 2000).

Por último, el anión superóxido puede dismutar espontáneamente produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno, aunque esta reacción es más lenta ($k \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Yu 1994) que la dismutación observada en la reacción 2, probablemente debida a la repulsión electrostática (Halliwell 1980).



Así la dismutación es más rápida a valores de pH ácido, necesarios para protonar el radical superóxido más rápidamente, que a pH fisiológico. Según Fridovich (Fridovich 1978; Fridovich 1983) a pH 7,8 en un medio acuoso, la dismutación espontánea se produce a velocidad constante de $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Actúa fundamentalmente como un agente reductor donando su electrón extra. También lo puede hacer como agente oxidante, aunque de manera más pobre, en cuyo caso es reducido a peróxido de hidrógeno. Su reactividad química es alta en solventes orgánicos, aunque es poco reactivo en soluciones acuosas, lo que le permite difundir lejos de su lugar de formación, reaccionando con otras sustancias dentro de la

célula, comprometiendo el funcionamiento de la misma. El producido extracelularmente es capaz de entrar en las células a través de los canales aniónicos transmembrana (Freeman 1982). Ataca a moléculas como el ADN, fosfolípidos de membrana, polisacáridos, tioles y aminas. Aunque se piensa que la mayoría de sus efectos dañinos derivan de su capacidad para generar radicales libres altamente tóxicos como el radical hidroxilo, también se le ha implicado en el inicio y en la peroxidación lipídica (Nelson 1994).

Radical hidroperoxilo o dióxido de hidrógeno (HO_2) (Fridovich 1978; Fridovich 1983)

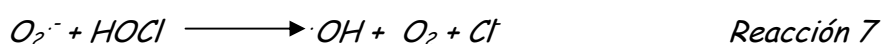
Es la forma protonada del radical superóxido, más liposoluble. Puede reaccionar espontáneamente con otro radical hidroperoxilo originando peróxido de hidrógeno ($k= 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$):



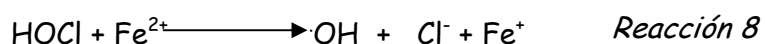
Es un oxidante mucho más potente que el radical superóxido y su vida media es mayor. Tiene un papel más importante de lo que se pensaba en la lesión oxidativa y posee la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica así como la oxidación de una amplia cantidad de compuestos biológicos (Slater 1984; Granger 1994). Sin embargo también ha sido implicado en las reacciones de terminación de la peroxidación lipídica (Omar 1990).

Radical hidroxilo o monóxido de hidrógeno ($\cdot OH$)

Estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de tres electrones. Se genera también en las reacciones de Haber-Weiss o en la de Fenton (reacción 4). Otros mecanismos por los que se puede formar radical hidroxilo in vivo, independiente de iones metálicos, es la interacción entre el radical superóxido y el ácido hipocloroso ($HOCl$), producidos ambos por los neutrófilos activados (Ramos 1992; Nappi 2000).



En presencia de hierro ferroso el ácido hipocloroso también puede producir radical hidroxilo (Nappi 2000).

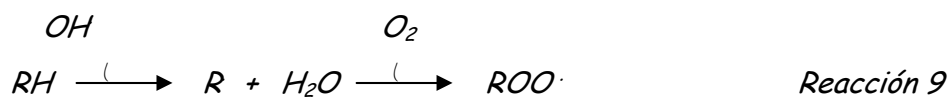


Es el oxidante más potente de los sistemas biológicos, el radical libre del oxígeno más reactivo que se conoce. Debido a esto su capacidad de difusión es mínima, reaccionando allí donde se produce (Del Maestro 1980; Halliwell 1984; Granger 1994). Se combina rápidamente con moléculas de su alrededor, cediendo o captando electrones, poniendo en marcha reacciones en cadena (Halliwell 1991). Su vida media es extremadamente corta (a 37°C, 1×10^{-9} segundos). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos reactivos, pueden difundir ciertas distancias desde su lugar de formación, generando radical hidroxilo cuando se encuentran con metales de transición. Reacciona con todas las

moléculas conocidas, y muy relevante es el daño que produce en el ADN donde induce mutaciones, en las enzimas a las que inactiva, y en las membranas en las que desencadena la peroxidación lipídica.

En el organismo no existen sistemas de defensa directos para neutralizar el radical hidroxilo.

Radical peroxilo (ROO): lo más característico es su formación en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (RH). (R : radical alquilo) (Bulkley 1983; Granger 1994).



Posee una relativa baja capacidad oxidante y una menor reactividad en relación con el radical hidroxilo; su vida media es mayor (a 37°C, 1×10^{-2} segundos), lo que le confiere una mayor capacidad de difusión en los sistemas biológicos.

Puede captar un átomo de hidrógeno de un lípido produciendo una reacción en cadena (ROOH: hidroperóxido lipídico).



Los radicales peroxilo también iniciarán la oxidación de proteínas y carbohidratos.

Radical alcoxilo (RO): el radical superóxido puede reaccionar con los hidroperóxidos lipídicos y formar radicales alcoxilo; es, por tanto, un radical orgánico. Su reactividad con los lípidos es intermedia entre el radical peroxilo e hidroxilo (vida media a 37°C, 1×10^{-6} segundos).

Óxidos de nitrógeno: en esta categoría se incluyen radicales como el óxido nítrico (NO) y el dióxido de nitrógeno (NO_2), que se combinan con los ROS para formar peroxinitrito (ONOO⁻), disminuyendo así su biodisponibilidad para realizar las numerosas funciones que desempeña.

El peroxinitrito es una especie formada por la reacción entre el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (NO). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede ser producido por enzimas como la NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS) xantina oxidasa (XO), lipooxigenasa (LOX), P450 oxidasa y citocromo b5 y por vías no enzimáticas en diversos sitios celulares por la reducción incompleta del oxígeno molecular cuando se adiciona un electrón. Por otra parte, el NO es sintetizado por la óxido nítrico sintasa a partir de L-arginina, O_2 y NADPH.

Además, el peroxinitrito puede protonarse bajo condiciones fisiológicas para formar el ácido peroxinitroso (ONOOH) y este a su vez puede descomponerse en radical hidroxilo y radical dióxido de nitrógeno. Estas moléculas químicamente derivadas del nitrógeno se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERN's). Entre las ERN's se encuentran los radicales óxido nítrico, (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y los no

radicales como el ácido nitroso (HNO_2), catión nitronio (NO_2^+), catión nitroxilo (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), ONOOH y alquilperoxinitritos (RONOO) y peroxinitrito (ONOO^-) (Ignarro 2000).

Cabe destacar que numerosas condiciones patológicas, como las sometidas a estudio en esta investigación, están asociadas con un incremento vascular en la producción de ROS. Esta forma de estrés oxidante vascular, y particularmente la interacción entre NO y ROS representa un mecanismo patológico común presente en muchísimos de los factores de riesgo ateroscleróticos (Kojda 1999).

3.3.2. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO NO RADICALES.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Es el estado reducido del oxígeno molecular por la ganancia de dos electrones del ión peróxido. Éste no es un radical libre ya que no posee electrones desapareados. Todo ión peróxido formado, a pH fisiológico se protonará inmediatamente a peróxido de hidrógeno ya que su pKa es muy alto. La dismutación del radical superóxido, ya sea de manera espontánea (reacción 5) o catalizada por la superóxido dismutasa (reacción 22) es la fuente más importante de peróxido de hidrógeno. La reacción no catalizada entre dos radicales hidroperoxilo (reacción 6) y entre los radicales superóxido e hidroperoxilo (reacción 2), también lo producen.

El peróxido de hidrógeno es un oxidante y reductor débil, por ello es relativamente estable y poco reactivo en ausencia de iones metálicos. Por sí mismo oxida lentamente la mayoría de las moléculas orgánicas en un medio acuoso, esencialmente los grupos sulfhidrilo. No obstante, puede ser muy tóxico para las células, ya que reaccionando con el radical superóxido (Reacción de Haber-Weiss) o no (Reacción de Fenton), en presencia de iones de hierro o de cobre, que actúan como catalizadores, forman radicales altamente reactivos, como el radical hidroxilo (Gutteridge 1983).

El peróxido de hidrógeno es además sustrato de la enzima mieloperoxidasa que cataliza una reacción en la cual se produce un producto altamente oxidante como el ácido hipocloroso (reacción 12).

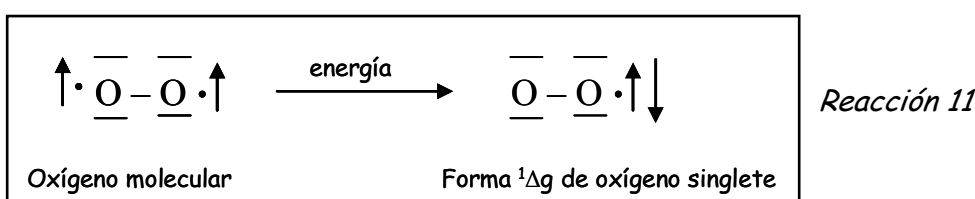
Se mezcla muy bien con el agua y es tratado por el organismo como a la misma, lo que le proporciona una gran capacidad de oxidación, atravesando con relativa facilidad las membranas. La base de esto reside en su estado no ionizado y de poca carga (Freeman 1982; Yu 1994).

Oxígeno singlete (1O_2)

Como se ha comentado, el oxígeno molecular posee dos electrones desapareados. En su estado fundamental ($^3\Sigma_g, ^3O_2$) es un triplete con giros paralelos.

El oxígeno molecular puede absorber una determinada cantidad de energía (mínimo 23 kcal/mol), con lo que uno de sus electrones

desapareados salta a un orbital de mayor energía e invierte su giro. Aunque esto no lo convierte en un radical, es una forma reactiva del oxígeno en la que se ha eliminado la restricción cinética que supone tener dos electrones desapareados con giros paralelos, incrementándose su capacidad oxidante. Es lo que se denomina oxígeno singlete, del que existen dos formas. El más importante en biología es la forma delta (${}^1\Delta_g$) la cual tiene dos electrones apareados ocupando el mismo orbital, con el otro orbital vacío:



La energía necesaria para que se produzca la reacción anterior la puede aportar la misma luz visible.

Es un poderoso agente oxidante, muy reactivo. Su vida media a 37°C es de 1×10^{-6} segundos. El ADN es uno de los lugares donde actúa (Cadet 1994). También se ha implicado en la peroxidación lipídica (Kellogg 1975; Slater 1984; Weiss 1989).

Ácido hipocloroso (HOCl)(Weiss 1989)

Un mecanismo de defensa utilizado por los neutrófilos, pero no por los macrófagos, es la producción de ácido hipocloroso. La activación de los neutrófilos libera la enzima mieloperoxidasa al medio extracelular, donde

cataliza fundamentalmente la oxidación de iones cloro por el peróxido de hidrógeno (formado por la dismutación del radical superóxido generado por la NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana de los neutrófilos) (Babior 1978; Babior 1981; Rossi 1986) a ácido hipocloroso (HOCl).



El ácido hipocloroso es un agente antibacteriano muy potente. Actúa a bajas concentraciones dañando las proteínas de membrana (al oxidar sus grupos sulfhidrilo) e impidiendo su función, mientras que a altas concentraciones las células sufren lisis por daño oxidativo generalizado (potenciales dianas son las aminas, aminoácidos, tioles, nucleótidos, hemoproteínas,...). También puede producir una modificación oxidativa de la superóxido dismutasa, perdiendo ésta su actividad (Auchère 2001).

3.4. GÉNESIS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (Del Maestro 1980; Freeman 1982; McCord 1983; Southorn 1988 ; Crystal 1991; Halliwell 1994; Stryer 1995).

Las reacciones químicas consisten en la destrucción de enlaces químicos existentes en las moléculas que reaccionan, y la formación de otros nuevos para originar los productos de la reacción. Esto implica la ruptura de los orbitales moleculares y la aparición transitoria de estructuras intermedias. Según sea el tipo de ruptura del enlace covalente, será la

naturaleza de esas especies químicas intermedias y provisionales. La heterólisis es la desigualdad en el reparto de electrones respecto al de protones y origina dos especies químicas con carga eléctrica o iones, los cuales en principio tienen todos sus orbitales completos con dos electrones o vacíos. La homólisis produce radicales libres, ya que la ruptura del enlace covalente se hace de forma que cada uno de los electrones del orbital molecular del enlace, queda en cada una de las partes, en orbitales atómicos que contendrán cada uno de ellos uno de los electrones (Marquina 2000). Además, los radicales libres se pueden generar en reacciones de transferencia de electrones. En general estos procesos se producen a través de la absorción de radiación ionizante, ultravioleta, visible o térmica; o por reacciones redox tales como las de transferencia de electrones no enzimática, reacciones catalizadas por metales o procesos catalizados por enzimas (Pryor 1973; Slater 1984). Las reacciones en las que están implicados los radicales libres son fundamentales para el normal funcionamiento de un amplio espectro de procesos biológicos. Debido a la ubicuidad del oxígeno molecular en los organismos aeróbicos y su capacidad de aceptar fácilmente electrones, las especies reactivas del oxígeno en gran medida median las reacciones en las que se implica un radical libre a nivel celular. En el organismo, las especies reactivas del oxígeno derivan de fuentes endógenas y exógenas:

3.4.1. FUENTES ENDÓGENAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

Son generadas en los procesos biológicos intra y extracelulares normales y patológicos, en prácticamente todos los tejidos. Pueden producirse de forma exagerada e inadecuada, o en un medio en el que las defensas que normalmente protegen a los tejidos son insuficientes.

En la fig 6 podemos ver las fuentes potenciales de radicales libres de oxígeno, que vamos a analizar a continuación.

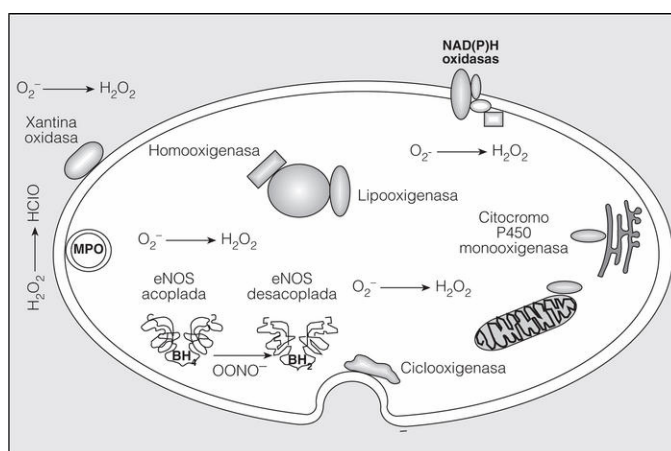


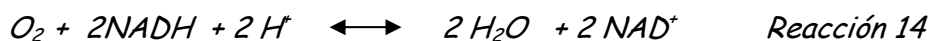
Fig 6: Fuentes potenciales de radicales libres de oxígeno. Muchas enzimas, como las que participan en el transporte mitocondrial de electrones, xantina oxidasa, ciclooxygenasas, lipooxigenasas, mieloperoxidasas, citocromo P450 monooxigenasa, óxido nítrico sintetasa (eNOS) desacoplada, hemooxigenasas, peroxidasas y dinucleótido de nicotinamida y adenina o fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina --NAD(P)H oxidasas--, producen radicales libres de oxígeno. Dependiendo de su localización en la célula, estos radicales libres de oxígeno se generan intracelular, extracelularmente o en compartimientos intracelulares específicos. O_2^- : radical anión superóxido; H_2O_2 :

peróxido de hidrógeno; OONO : peroxinitrito; BH₄: tetrahidrobiopterina; BH₂: dihidrobiopterina. (Adaptada con permiso de (Griendling 2003).

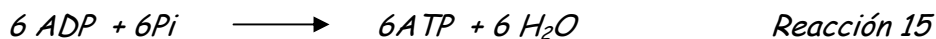
Cadena de transporte electrónico mitocondrial: aproximadamente el 95% de todo el oxígeno consumido por las células de los mamíferos se metaboliza en la mitocondria, donde es reducido por cuatro electrones, produciendo dos moléculas de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mediante la vía de la reducción tetravalente, la cual está catalizada en última instancia por la citocromo oxidasa (Antonini 1970):



De manera simultánea el NADH (nicotinamin adenindinucleótido) es oxidado a NAD⁺.



Y se forman 6 moléculas de ATP a partir de ADP (adenosíndifosfato) y Pi (ortofosfato) (Siggaard-Andersen 1995).



Sin embargo, entre un 0,5 y un 2% del oxígeno escapa de esta vía y sufre una reducción univalente (McCord 1983; Boveris 2000). Como hemos visto en la Fig 3, el oxígeno también puede ser reducido sucesivamente por un único electrón durante el metabolismo aeróbico normal y producir

metabolitos reactivos del oxígeno parcialmente reducidos y altamente tóxicos: el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$) y el radical hidroxilo (OH)(Boveris 2000; Turrens 2003). El porcentaje en la formación de radical superóxido, es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno utilizado por la mitocondria (Boveris 1973).

Sistemas de transporte electrónico a nivel de retículo endoplasmático y la membrana nuclear: *ambas membranas intracelulares contienen citocromos P_{450} y b_5 , los cuales por autooxidación pueden generar ROS; sin embargo, es difícil evaluar la contribución de ambas membranas en la producción de radical superóxido y peróxido de hidrógeno en el conjunto de la producción celular.*

Peroxisomas: *a nivel celular, los peroxisomas son un lugar importante de producción de especies reactivas del oxígeno debido a su alta concentración en oxidasas (Keller 1991).*

Membrana plasmática: *la membrana plasmática es un lugar crítico en relación a las reacciones que producen los radicales libres sobre ella. Los generados extracelularmente pueden atravesarla antes de reaccionar con otros componentes celulares, pudiendo iniciar su toxicidad en ésta.*

Mención aparte merece la membrana plasmática de los fagocitos, la cual es una fuente importante de ROS, debido a la presencia en la misma de la NAPDHoxidasa.

Células inflamatorias (Weiss 1989; Rosen 1995): sacando provecho de su agresividad química, las especies reactivas del oxígeno han sido incorporadas a ciertos mecanismos defensivos para la destrucción de bacterias o agentes extraños (Babior 1973). Producidas durante la actividad fagocítica, en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, son esenciales para la defensa contra la invasión microbiana (Babior 1978).

La estimulación de los receptores de la membrana de los fagocitos por el complemento, endotoxinas, leucotrieno B₄, inmunocomplejos y el factor activador de plaquetas (PDGF), activan la NADPHoxidasa que se encuentra en la membrana leucocitaria, la cual reduce el oxígeno molecular exclusivamente, generando grandes cantidades de radical superóxido (Babior 1978; Rossi 1986). Esta enzima cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH (producto de la vía de las pentosas fosfato) al oxígeno molecular. Normalmente la NADPHoxidasa se encuentra en estado latente (Rossi 1986).



Además, los leucocitos activados producen ROS a través del metabolismo del ácido araquidónico en la vía de la ciclooxigenasa (Rowe 1983).

En el llamado "estallido respiratorio" se producen especies reactivas del oxígeno: radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y radical hidroxilo (Babior 1973; Babior 1978; Johnston 1978; Rosen 1995).

Desgraciadamente, la formación de estas durante el ataque a los microorganismos, puede también dañar los tejidos del huésped.

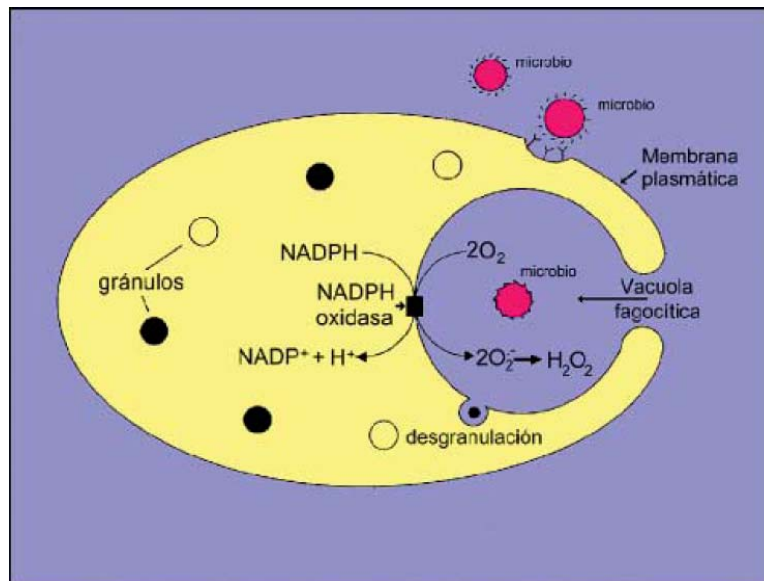


Fig 7: Representación esquemática de un fagocito atrapando un microorganismo en la vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa se activa selectivamente en la membrana de la vacuola y genera O_2^- y H_2O_2 en el lumen de la vacuola. Otros enzimas se liberan en la vacuola por desgranulación de los gránulos citoplasmáticos (Segal 1993).

Además, hay que tener en cuenta que en la microcirculación existen potenciales fuentes enzimáticas de ROS además de la NAD(P)H oxidasa; la xantina oxidasa (XO), y la óxido nítrico sintasa (NOS) que vamos a analizar a continuación.

Xantina Oxidasa (XO) (Parks 1986; Harrison 2002; Meneshian 2002): la xantina oxidoreductasa de los mamíferos existe en dos formas interconvertibles funcionalmente distintas, la xantina deshidrogenasa

(XDH) y la xantina oxidasa (XO), y son producto alternativo del mismo gen. Se localizan en el citosol y en la superficie de la membrana celular. Es un homodímero con un Pm de aproximadamente 300 KDa, compuesto por subunidades catalíticamente independientes. Cada una de estas se compone de tres dominios que contienen cuatro centros redox, un dominio N-terminal (20Kda) con dos centros ferrosulfurados (Fe_2S_2), un dominio central FAD (flavin-adenin-dinucleótido)(40Kda), y un dominio C-terminal con una molécula de molibdopterina con un átomo de Mo como cofactor (85 Kda) (Hille 1995; Harrison 2002; Meneshian 2002). Estas enzimas contienen 36 exones cuya estructura exón-intrón mantiene una homología de aproximadamente un 90% entre las enzimas de rata y las de humanos (Nishino 1994) y se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 (2p22).

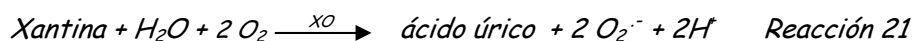
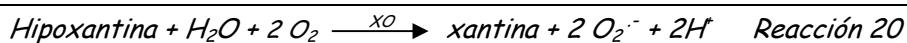
La xantina oxidasa y la xantina deshidrogenasa muestran reactividades diferentes hacia el oxígeno molecular y el NAD^+ , prefiriendo el primero la xantina oxidasa y el segundo la deshidrogenasa (Nishino 1994).

Su distribución es muy amplia, detectable en plasma y (Yokoyama 1990; Tan 1993), leucocitos (Tubaro 1980; Grum 1990), macrófagos (Rinaldo 1994), en las células parenquimatosas de múltiples tejidos, intestino delgado, hígado, pulmón, y en el endotelio vascular de arterias, venas y endocardio (Ratych 1987).

Es una enzima muy versátil, participa en la oxidación de una amplia variedad de sustratos tanto endógenos, ej: las purinas, como exógenos, por ejemplo el alcohol. Su función más reconocida es como factor

limitante de la degradación de ácidos nucleicos, durante la cual las purinas son degradadas hasta ácido úrico a expensas de la producción de anión superóxido. Esta dualidad de la XO le confiere la capacidad de producir potentes oxidantes, pero también genera ácido úrico, un potente antioxidante (Ames 1981; Halliwell 1990; Becker 1993), aunque existen dudas de su efecto ya que también aumenta el riesgo cardiovascular (Wannamethee 2005).

En la proteólisis que sufre la xantina deshidrogenasa para formar xantina oxidasa irreversible, se elimina de la molécula precursora un fragmento polipeptídico N-terminal (20Kda) de una de las subunidades, el cual contiene aproximadamente 10 grupos sulfhidrilo (Parks 1986); éste fragmento no es esencial para la actividad oxidasa, pero sí lo es para mantener la conformación enzimática requerida para la unión y la interacción apropiada con el NAD⁺ (Waud 1976; Waud 1976).



Hoy sabemos que la xantina oxidasa produce además de radical superóxido, peróxido de hidrógeno (Fridovich 1970; Porras 1981) dependiendo de si se produce la reducción univalente del oxígeno que dará lugar a la formación de superóxido (McCord 1968) o la reducción divalente del mismo que formará peróxido de hidrógeno (Fridovich 1970).

El que siga una vía u otra depende del pH y de la tensión de oxígeno (Fridovich 1970).

Óxido Nítrico Sintetasa Endotelial desacoplada (eNOS): el óxido nítrico (NO) es generado por la conversión de L-arginina y L-citrulina por la acción enzimática de la NOSintasa (NOS) dependiente de NADPH y de Ca^{2+} /calmodulina, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactores (Moncada 1991; Moncada 1993; Nathan 1994; Stuehr 1999). En condiciones normales, no es limitante el sustrato de la reacción si no los niveles de dichos cofactores; sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo como en HTA y las dislipemias, los niveles de BH₄ se reducen en los tejidos (ver fig 8).

En los vasos, el NO es producido desde el endotelio por la isoforma endotelial de la NOS (eNOS) cuya expresión es constitutiva; dicha enzima se activa por mecanismos de estrés como la fuerza mecánica ejercida por la sangre y es estimulada por antagonistas como la brakidina y acetilcolina. Por su parte, el NO posee numerosas funciones, pero su acción como factor relajante derivado del endotelio (EDRF), es la más importante para el mantenimiento de la homeostasis vascular (Palmer 1987). El NO modula el flujo vascular y tiene importantes efectos antiaterogénicos en las plaquetas, células musculares lisas y células endoteliales. En humanos, la función endotelial mediada por NO es deficiente en estados preateroscleróticos, y diversos estudios

consideran que la disfunción endotelial es un predictor independiente de futuros episodios cardiovasculares (Channon 2002). Los mecanismos por los cuáles se produce una menor disponibilidad de NO son múltiples. Por una parte, la producción de ROS reacciona rápidamente con el NO y contribuye a su déficit. Además, el ONOO⁻ formado por la reacción NO-superóxido tiene efectos nocivos sobre la función vascular a través de la oxidación de proteínas, lípidos y toxicidad celular.

Por otra parte, la eNOS puede generar superóxido en vez de NO en determinadas circunstancias, como cuando existe un déficit del cofactor tetrahydrobiopterina (BH4) o en respuesta de estímulos aterogénicos como la hiperglucemia o hipercolesterolemia (Channon 2002; Fenster 2003) Ver Fig 8. Diversos estudios han demostrado una mejoría de la función endotelial tras la suplementación con BH4 (Stroes 1997; Heitzer 2000).

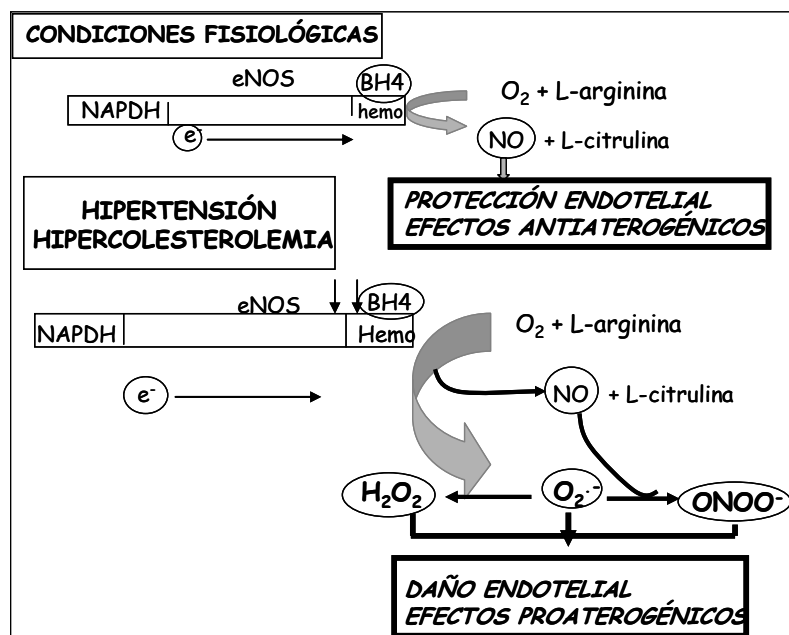


Fig 8: en condiciones fisiológicas, los niveles de BH4 en los tejidos son óptimos para la actividad catalítica de la eNOS, y la activación de la eNOS genera NO y L-citrulina. El NO generado por la eNOS actúa como molécula antiaterogénica. Con HTA e hipercolesterolemia, cuando el estrés oxidativo aumenta, los niveles de BH4 en los tejidos se reducen. Con niveles de BH4 por debajo del óptimo, la activación de la eNOS da lugar a la "eNOS desacoplada" con la consiguiente generación de superóxido en vez de NO. El superóxido, y consecuentemente el peroxinitrito y el peróxido de hidrógeno van a dañar las células endoteliales y entonces promoverá la aterosclerosis.

3.4.2. FUENTES EXÓGENAS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

Muchos de los efectos quimioterápicos y efectos colaterales citotóxicos de agentes antineoplásicos, antibióticos, antraciclinas...que dependen de la unión con metales para su actividad, se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a ROS.

Los derivados de influencias externas, tales como la irradiación de los organismos con radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) y particularmente la radiación ionizante, la cuál daña los tejidos por causar fisión del enlace del agua, produciendo átomos de hidrógeno, electrones hidratados y radicales hidroxilo. En presencia de oxígeno además originará radical superóxido y peróxido de hidrógeno.

La luz a longitudes de onda determinadas puede causar fotolisis en los enlaces químicos y producir radicales libres. Los ultrasonidos también pueden producir efectos semejantes (Riesz 1992).

3.5. SISTEMA DEFENSIVO ANTIOXIDANTE.

A menudo el término antioxidante y eliminador (scavenger) se utilizan como sinónimos de forma incorrecta, para describir sustancias que descompondrán o eliminarán radicales libres y oxidantes. De hecho el término antioxidante es una amplia descripción de numerosas sustancias de las cuales los eliminadores representan sólo una categoría.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell 1990; Gutteridge 1995). El término "sustrato oxidable" incluye a cualquier molécula oxidable por un radical libre, como proteínas, lípidos, ADN, carbohidratos...

Un eliminador de radicales libres, es una sustancia que donará un electrón a un radical libre inactivándolo, de esta interacción surgirá una especie radical del eliminador, la cual tiene poca reactividad y por lo tanto es poco dañina. Sin embargo, la interacción de algunos eliminadores con radicales libres producirá especies radicales bastante reactivas que pueden inactivar enzimas y promover la lesión oxidativa (Halliwell 1990).

Se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante, de prevención en la generación, intercepción una vez formados y reparación del daño oxidativo o eliminación de las moléculas dañadas. Los ROS se pueden producir tanto en medios acuosos como lipídicos, y para minimizar sus efectos dañinos existen antioxidantes hidro y liposolubles. El que existan tantos sistemas antioxidantes intra y extracelulares, y el que estén tan distribuidos en los seres vivos refleja la enorme importancia de estar a salvo de la oxidación.

Los ROS pueden ser eliminados mediante sistemas enzimáticos y un sistema no enzimático de pequeñas moléculas. Es lo que se denomina defensa primaria contra el daño oxidativo. Como regla general la mayor concentración de antioxidantes enzimáticos es intracelular (aunque también poseen localización extracelular algunas enzimas como la SOD y algunas peroxidasas), mientras que la mayor concentración de la mayoría de los antioxidantes no enzimáticos se encuentra en el líquido extracelular. En la Tabla 1 podemos ver una clasificación de los

antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción. A su vez, los niveles tanto de un tipo de antioxidante como del otro, varían de un tejido a otro.

Tabla 1: Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.

| Intracelular | Membrana | Extracelular |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <i>Superóxido Dismutasa</i> | <i>Vit E</i> | <i>Ceruloplasmina</i> |
| <i>Catalasa</i> | <i>β-caroteno</i> | <i>Transferrinas</i> |
| <i>Peroxidasas</i> | <i>Ubiquinol-10</i> | <i>Lactoferrinas</i> |
| <i>GSH</i> | | <i>Albúminas</i> |
| <i>Tiorredoxina</i> | | <i>Haptoglobinas</i> |
| <i>Prot que ligan metales</i> | | <i>Vit C</i> |
| <i>Sistemas proteolíticos</i> | | <i>Ácido Úrico</i> |
| <i>Vit C</i> | | <i>Vit E</i> |

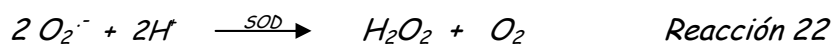
Ya que las defensas antioxidantes no son efectivas completamente, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadoras que se encarga de eliminar las moléculas dañadas por las ROS. Es lo que se llama defensa secundaria contra el daño oxidativo. De manera que todo ello en su conjunto constituye un sistema perfectamente integrado que contrarresta el EO provocado por las ROS.

3.5.1. DEFENSAS PRIMARIAS ENDÓGENAS

3.5.1.1: Antioxidantes enzimáticos: a grandes rasgos se caracterizan por utilizar iones metálicos (Fe, Zn, Cu, Mn y Se) como elementos catalíticos esenciales.

Superóxido Dismutasa (SOD): existen diferentes isoformas de estas metaloenzimas, diferenciándose en su estructura y según contenga uno u otro ión metálico en su centro activo, separándose en dos clases filogenéticas dependiendo de la similitud en la secuencia de aminoácidos, pero todas ellas catalizan la misma reacción química (reacción 22) con una eficacia comparable (Hassan 1980; Fridovich 1983). Incluye enzimas localizadas en orgánulos, compartimentos subcelulares y en pequeñas cantidades en líquidos extracelulares.

Su función fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord 1969). Cataliza una reacción de dismutación que consiste en la oxidación de un radical superóxido a oxígeno molecular y la reducción de otro radical superóxido a peróxido de hidrógeno (Reacción 22):



Puede producirse espontáneamente a pH 7,4 y a una $k \cong 2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ (reacción 5) en cuyo caso se trata de una reacción de segundo orden dependiente de la concentración de radical superóxido (Fridovich 1978; Fridovich 1983), o ser acelerada aproximadamente 10000 veces ($k = 2,3 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) por la acción de la superóxido dismutasa (Klug 1972;

Fridovich 1978; Cudd 1982), siendo esta última una reacción de primer orden, por lo que la vida media del radical superóxido es independiente de su concentración (Klug 1972; Fridovich 1978; Cudd 1982; Fridovich 1983).

Excluyendo algunas excepciones (Fridovich 1978; Fridovich 1983), las diferentes superóxido dismutasas se distribuyen en las células eucariotas. La Cu,Zn-SOD (dimérica, Pm= 30 kDa y cuyo gen se localiza en el cromosoma 11), aunque habitualmente se le describe como una enzima citoplasmática, también se ha localizado en el espacio intermembrana de la mitocondria (Weisiger 1973), en el núcleo, lisosomas y en los peroxisomas (Keller 1991); la Mn-SOD (tetramérica, Pm= 80 kDa y su gen se localiza en el cromosoma 6) de origen procariota, si bien se localiza esencialmente en la matriz mitocondrial, también se encuentra en el citosol, donde según (Weisiger 1973) tiene lugar su biosíntesis, siendo entonces transportada al interior de la mitocondria. La Cu,Zn-SOD se distribuye principalmente en los tejidos con gran actividad metabólica (hígado, riñón) y la Mn-SOD en aquellos que el proceso respiratorio es alto (miocardio); este patrón de distribución es bastante constante en los mamíferos (Marklund 1984).

Otra isoenzima es superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), que también posee Cu y Zn , pero es muy diferente a la forma intracelular (Marklund 2002). Se secreta al plasma y líquido intersticial, donde es de lejos el isoenzima predominante. Sin embargo, de manera general a nivel tisular su presencia es menor aunque hay grandes diferencias entre

especies (Stralin 1995). A diferencia de la Mn-SOD y la Cu,Zn-SOD, ésta muestra un patrón de distribución diferente, el cual no está relacionado con la actividad metabólica de los tejidos (Marklund 1984). En los mamíferos, el 90-99% de la EC-SOD se localiza en los tejidos, unida en su mayor parte a los proteoglicanos heparán sulfato en la superficie celular (principalmente del endotelio), en la membrana basal y en la matriz del tejido conectivo, lo cual determina la distribución y retención del enzima in vivo. Sin embargo, en algunos casos, puede almacenarse intracelularmente en vesículas secretoras, sin tenerse la certeza que contribuya en la protección contra el radical superóxido (Karlsson 1993; Marklund 2002).

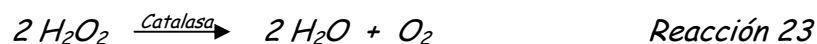
Existe otro tipo de superóxido dismutasa, estrechamente relacionada con la Mn-SOD que contiene hierro (Fe-SOD), de origen procarionota pero que sólo se encuentra en algunas especies de bacterias y plantas.

Por tanto, el ámbito de actuación de la SOD es muy amplio, puede hacerlo a nivel extracelular, pero fundamentalmente lo hace en el intracelular, en la mitocondria y compartimentos citosólicos.

La regulación de su producción es sensible tanto a la cantidad de oxígeno tisular, como a la producción de radical superóxido intracelular (Halliwell 1978; Hassan 1980; Fridovich 1983; Yu 1994; Turrens 2003).

Catalasa (Cat): catalizan la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (reacción 23) con una actividad

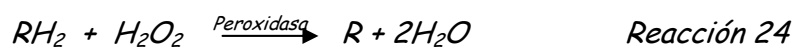
molecular de las más altas que se conocen; estas enzimas abundan en los peroxisomas, posee un peso molecular muy alto (240 kDa y su gen en humanos se localiza en el cromosoma 11) y es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de Fe realiza el intercambio redox.



Actúa sobre todo cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno son altas (Halliwell 1978). Se distribuye ampliamente por los tejidos, localizándose fundamentalmente en los peroxisomas, aunque también se ha descrito su presencia en la mitocondria de corazón, pero no en la de otros tejidos incluido el músculo esquelético (Turrens 2003). Su actividad varía no tan sólo según el órgano estudiado, sino en la misma célula; algunas de éstas estimulan la producción de catalasa ante incrementos de la producción de peróxido de hidrógeno.

Como en el caso de la SOD la vida media de la catalasa también es corta, y al igual que la anterior debe producirse continuamente. Su actividad en el medio extracelular es insignificante.

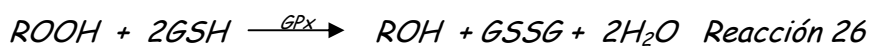
Peroxidasa: al igual que la catalasa también puede contener hierro. Reducen el peróxido de hidrógeno a agua, y utilizan una gran variedad de donadores de electrones para tal propósito.



*Ciclo redox del glutati3n: las **Glutati3n Peroxidasas (GPx)** son m1s importantes que la catalasa para eliminar el per3xido de hidr3geno en el ser humano, ya que act1an a niveles bajos de 3ste. La GPx (Reacci3n 25 y 26) cataliza la reducci3n del per3xido de hidr3geno y la de los hidroper3xidos lip3dicos a agua en el primer caso, y alcoholes estables y agua en el segundo, mediante la oxidaci3n del glutati3n reducido (GSH) a glutati3n oxidado (GSSG).*



y



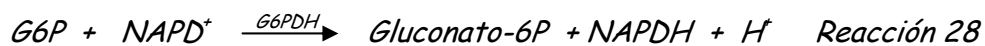
Hay dos tipos de GPx, una forma enzim1tica es dependiente de Se, elemento que es esencial para su actividad y controla la s3ntesis de la prote3na, es tetram3rica y tiene entre 80 kDa (GPx 1 cuyo gen se localiza en el cromosoma 3). Elimina tanto hidroper3xidos org1nicos (ROOH) como inorg1nicos (H₂O₂). La otra forma no tiene Se, tiene un peso molecular menor, es dim3rica y s3lo es capaz de eliminar ROOH. Las GPx a nivel intracelular se localizan en el citosol y la matriz mitocondrial. Las diferentes isoenzimas que se conocen se expresan en tejidos espec3ficos. Se sabe que la expresi3n de la GPx es inducida por estr3s oxidativo y que una expresi3n aberrante de la misma est1 asociada a una gran variedad de patolog3as, incluyendo la hepatitis y varios tipos de c1nceres como el de piel, ri3n3n intestino o pecho (Townsend 2003).

La reacción de reducción del GSH, catalizada por la **Glutación Reductasa (GR)** (Reacción 27) se encarga de regenerar el GSH consumido, y es clave en la defensa antioxidante.



Puesto que el pool de GSH celular es limitado y la elevación de la tasa GSSG/GSH es altamente tóxica para la célula, esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento de la eliminación de H₂O₂ por la vía de la GPx, así como para la reconstitución del GSH oxidado no enzimáticamente. La GR presenta FAD unido a la enzima, que es esencial al actuar como coenzima y el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 3. Están presentes en el citosol y la mitocondria (Wang 1998).

La **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)** cataliza la regeneración del NAPD⁺ (Reacción 28), necesario para mantener el GSH reducido, en la vía de las pentosas fosfato.



La deficiencia en la G6PDH (cuyo gen se localiza en el cromosoma X) causa anemia hemolítica a causa de la falta de NAPDH.

Como último componente del sistema del glutación hay que hablar de la molécula de **GSH**.

Glutación reducido (GSH): El GSH es el tior (SH) no proteico más abundante en todas las especies aeróbicas, con concentraciones intracelulares entre 0.5 y 10 mM; en contraste con la concentraciones de GSH extracelular que son normalmente entre 3 y 4 ordenes de magnitud más bajas. Su característica estructural más importante es la presencia del grupo tior de la cisteína, la cuál le proporciona la peculiaridad de poder participar en reacciones redox, es decir, se puede oxidar formando el glutación oxidado o glutación disulfuro (GSSG). En condiciones fisiológicas la GR mantiene el 98% del GSH intracelular en estado reducido, el resto se encuentra en la célula oxidado (GSSG), interaccionando con proteínas (GS-S-proteína) o formando tio-eter. Por tanto, un aumento en la génesis de peróxidos o especies oxidantes producirá un paso de la forma reducida a la oxidada y, por tanto, un aumento del cociente GSSG/GSH. Un aspecto interesante del estatus del glutación como índice de estrés oxidativo es que el estatus sanguíneo del glutación refleja el daño que se ha producido en otros tejidos, ya que la forma oxidada, en condiciones de estrés oxidativo, puede atravesar fácilmente las membranas biológicas y acceder al torrente sanguíneo (Sáez 1990).

Sin embargo, un estrés oxidativo donde la actividad GR esté afectada, la capacidad de la célula de reducir GSSG estaría mermada y este se acumularía en el citosol. Para proteger de este cambio en el equilibrio

redox la célula puede transportar activamente GSSG al exterior. Mientras, el GSSG podría reaccionar con grupos sulfhidrilos de las proteínas celulares mezclando reacciones disulfuro, este proceso podría perjudicar las funciones proteicas (Dickinson 2002).

El GSH es un tripéptido (Glutamato-Cisteína-Glicina) y gracias al residuo de Cys es un compuesto fácilmente metabolizable ya que puede ser oxidado por metales de transición o participar en el intercambio tiol- disulfuro.

Como se ha indicado, es la Cys el elemento funcional de la molécula de GSH, cuyas propiedades reactivas del grupo tiol es el responsable de algunas funciones del GSH. Estas funciones incluyen:

- 1) mantenimiento de la estructura y función de proteínas por reducción de los puentes disulfuro de las mismas.*
- 2) regulación de la síntesis y degradación de proteínas.*
- 3) mantenimiento de la función inmune.*
- 4) protección ante daño oxidativo.*
- 5) detoxificación de especies químicas.*
- 6) almacenaje y transporte de la forma activa de la cys (Wang 1998).*

Al igual que las vitaminas E y C, puede tener tanto acciones antioxidantes como oxidantes. El glutatión puede donar el átomo de hidrógeno de los grupos SH, produciéndose radicales GS en vez de GSH; éstos pueden reaccionar con el oxígeno y producir radicales oxisulfuro, potencialmente dañinos como el RSO.

Para una protección antioxidante eficaz se necesita la actuación sincronizada de las 3 tipos de enzimas: SOD, catalasa y GPx ya que la actividad enzimática de dichas enzimas puede verse también afectada por el ataque oxidativo.

El radical superóxido inactiva a la catalasa, a la que transforma accediendo al Fe y convirtiéndolo al estado poco activo ferroxí. A su vez, las peroxidasas que contienen Fe, también son inhibidas por el mismo mecanismo. Por lo tanto, la SOD protege a la catalasa y a la peroxidasa contra su inactivación (Kono 1982).

Al mismo tiempo, el peróxido de hidrógeno puede inactivar a la SOD (Hodgson 1975), acción prevenida por catalasas y peroxidasas.

Como se ha apuntado anteriormente la Cu,Zn-SOD puede generar radical hidroxilo desde peróxido de hidrógeno (Yim 1990), lo cual se favorecerá por un incremento en los niveles de SOD o una disminución en la de catalasa y peroxidasas. Por tanto es esencial que las células posean unos niveles equilibrados entre las tres enzimas, constituyendo un equipo defensivo al respaldarse mutuamente (Hodgson 1975; Freeman 1982; Kono 1982; Fridovich 1983).

3.5.1.2: Antioxidantes no enzimáticos.

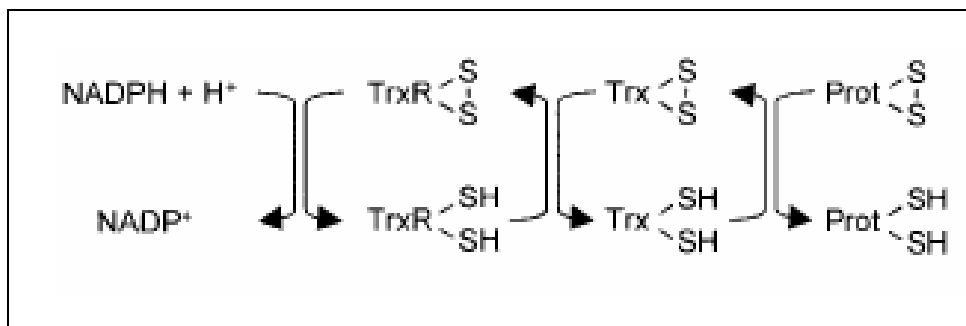
Se pueden subclasificar en antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos, lo cual permite proteger a todos los compartimentos del organismo. Hay interrelaciones importantes entre estos dos sistemas.

Tiorredoxina (TRX): son proteínas con actividad oxido-reductasa y su modo de acción es esencialmente igual que el del GSH; esto se debe a que el sitio activo de todas las TRX contiene una secuencia altamente conservada - Cys-Gly-Pro-Cys- que es esencial para su función como potente proteína disulfuro oxido-reductasa. Las proteínas sobre las que interactúa la TRX principalmente son ribonucleótido reductasa, proteínas disulfuro isomerasas y numerosos factores de transcripción tales como p53, NF- κ B y AP-1.

Encontramos 3 variantes humanas codificadas por distintos genes; TRX-1(la más estudiada y con 12kDa) , la TRX-2 localizada en mitocondria y la Sp-TRX altamente expresada en espermatozoides.

El sistema TRX contiene 2 oxidorreductasas, la TRX reductasa y la TRX-1; podemos ver en la Fig 9 su mecanismo de acción. La TRX-1 es expresada ubícuamente en células endoteliales y células musculares lisas de los vasos sanguíneos; una deficiencia en la expresión de TRX resulta un fenotipo letal, lo que recalca la importancia de la enzima (Filomeni 2002; Yamawaki 2003). En esta investigación se va a estudiar la actividad de la TRX-1 en células mononucleares de los pacientes seleccionados, ya que no existen datos previos de dicha actividad en linfomonocitos. El gen que codifica dicha proteína se localiza en el cromosoma 18 (18q 21.31).

Fig 9: Esquema del flujo de electrones en el sistema TRX (Miranda-Vizuet 2004).



3.5.1.3: Otros defensas antioxidantes.

Componentes del plasma como el **ácido úrico** y la **bilirrubina** constituyen otro grupo de antioxidantes no enzimáticos. El urato puede actuar como secuestrador de radicales hidróxilo y superóxido o como quelador de metales de transición. La forma radical libre de ácido úrico puede ser reducida por el ácido ascórbico (Ames 1981; Halliwell 1990; Santus 2001).

La **bilirrubina** es un antioxidante liposoluble y, por tanto, capaz de inhibir la lipoperoxidación. Es un pigmento biliar producido por el catabolismo del grupo hemo. La **albúmina** la transporta en el plasma, y en condiciones fisiológicas ambas pueden actuar como antioxidante. La bilirrubina unida a la albúmina, a concentraciones equimolares, compite con el ácido úrico por los radicales peroxilo, pero es menos eficiente

que la vitamina C en eliminarlos. Protege a los ácidos grasos transportados por la albúmina (Stocker 1987).

Por último, nos queda citar el grupo de moléculas antioxidantes que incluye ciertos quelantes de hierro y cobre como la **transferrina**, el mayor transportador plasmático de hierro del organismo (2 moles de Fe^{+++} por mol de proteína, Fig 10), **lactoferrina**, **ferritina**, **ceruloplasmina** y **albúmina**, así como proteínas que se unen con grupos hemo.

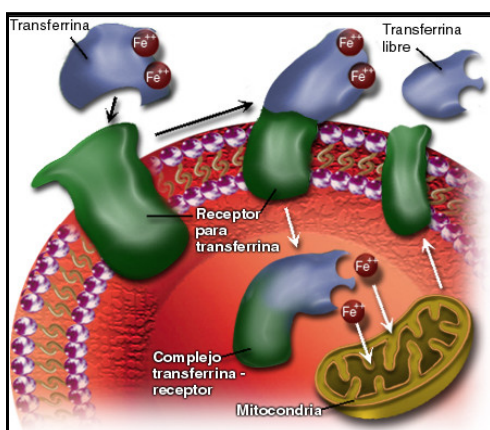


Fig 10: Mecanismo de transporte de Fe por la transferrina.

En condiciones normales, sólo el 30% de estas proteínas están asociadas al hierro, lo que deja bastantes moléculas libres para ligarse con ese metal si hay exceso del mismo.

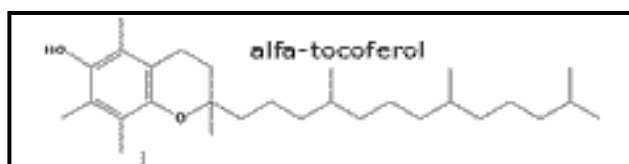
Esta capacidad de retener iones metálicos es una defensa antioxidante importante, ya que estos no pueden estimular la formación de radicales hidroxilo, y por consiguiente el estrés oxidativo. Además, este secuestro permite utilizar el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno para propósitos metabólicos, sin que logre hacer demasiado daño a los tejidos, siempre y cuando la cantidad de ROS no llegue a ser

suficiente para producir una lesión directa y/o movilizar los iones metálicos de sus lugares de almacenamiento.

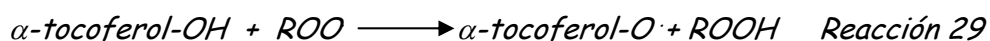
3.5.2. DEFENSAS PRIMARIAS EXÓGENAS.

α -tocoferol (Vitamina E): el α -tocoferol es el antioxidante liposoluble más efectivo e importante. Su concentración en los tejidos es más bien baja (Schüep 1994). Su concentración óptima es de 1200-1300 $\mu\text{g}/\text{dL}$ estandarizado según los lípidos plasmáticos (Marquez 2002). Se encuentra en diversas membranas celulares, lipoproteínas plasmáticas y flúidos extracelulares como el alveolar. Actúa interrumpiendo las reacciones en cadena de autooxidación, al transformarse en un radical estable, neutralizando los radicales peroxilo y alcoxilo. En la Fig 11 vemos la estructura del α -tocoferol para un mejor entendimiento de su modo de acción.

Fig 11: Estructura de la vitamina E



El átomo de hidrógeno del grupo hidroxílico fenólico es fácilmente eliminable. De este modo, los radicales peroxilo y alcoxilo formados durante la peroxidación lipídica, se combinan con el α -tocoferol en vez de con otro ácido graso, generando un hidropexórido orgánico y el radical tocoferol (α -tocoferol-O \cdot), el cual es bastante estable y muy poco reactivo, por lo que se corta la reacción en cadena.



Sin embargo, el α -tocoferol debe su potencia antioxidante no sólo a sus propiedades químicas, sino también a su movilidad y accesibilidad dentro de la membrana.

Aunque el α -tocoferol es un antioxidante liposoluble, el grupo hidroxilo de su núcleo está expuesto a la fase acuosa. Por lo tanto, es posible la interacción entre las ROS y el α -tocoferol.

Por su parte, el radical tocoferol puede emigrar a la superficie de la membrana y reconvertirse en α -tocoferol reaccionando con el ácido ascórbico (Packer 1979). Tanto el ácido ascórbico como el α -tocoferol parecen reducir al mínimo los efectos de la peroxidación lipídica en las lipoproteínas y las membranas, si el proceso ha comenzado. Los tioles como el GSH, también pueden reaccionar con los radicales tocoferol y regenerarlos a tocoferol, y de forma inversa, los tocoferoles también puede reparar los radicales tiol (Reacción 30).

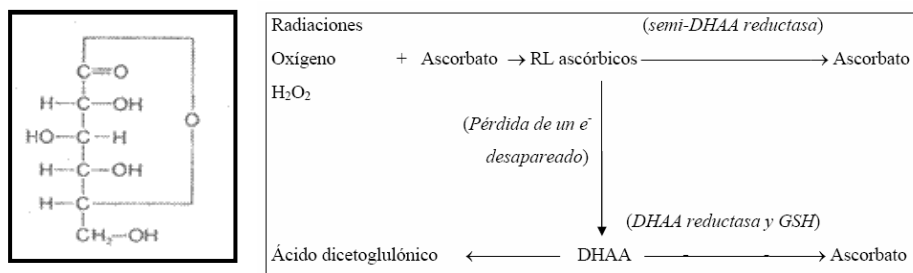
En contraposición, una alta concentración de vitamina E puede generar radicales libres actuando como prooxidante:



Es abundante en aceites vegetales de maíz o soja, germen de trigo y margarina.

Ácido ascórbico (Vitamina C): Vitamina hidrosoluble que se encuentra ampliamente distribuida en los fluidos intra y extracelulares. Entre sus muchas acciones antioxidantes descritas, destaca la de que actúa como un agente reductor, reaccionando directamente con los radicales superóxido, hidropéroxido, hidroxilo, diversos hidropéroxidos lipídicos, oxígeno singlete y ácido hipocloroso. Interactúa con el radical tocoferol para reconvertirlo en α -tocoferol (Packer 1979). Antes de ver en las reacciones que participa el ácido ascórbico veamos su estructura y su metabolismo en la Fig 12.

Fig 12: Estructura y metabolismo del ácido ascórbico.



El radical deshidroascorbato (DHAA) es poco reactivo y en consecuencia en él suelen acabar las reacciones en cadena, ya que por disprotonación produce vitamina C y ácido dicetoglulónico.

Paradójicamente la vitamina C también posee propiedades prooxidantes.

Durante la oxidación de ésta se forma peróxido de hidrógeno:

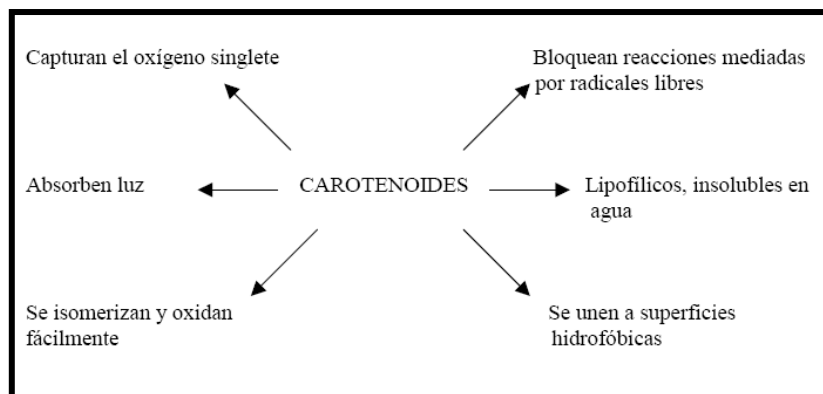


Cantidades excesivas de vitamina C también pueden actuar como prooxidantes en presencia de metales de transición (Fe, Cu...) induciendo a la peroxidación lipídica por su capacidad de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual es un potente inductor de la formación de radicales libres.

Las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico predominarán en condiciones normales debido al efecto secuestro (ej: almacenamiento por parte de la ferritina) de los iones metálicos de transición, cosa que puede no ocurrir en caso de enfermedad, situación en la que estarían más disponibles.

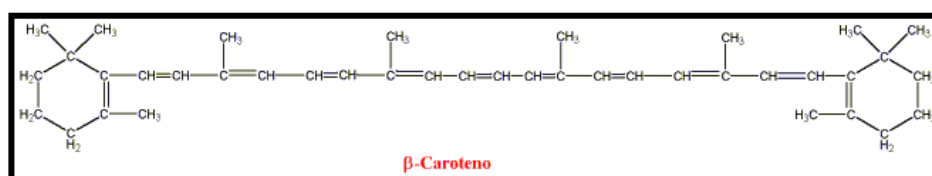
Carotenoides: *El rasgo estructural distintivo de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados, el cual consiste en alternar enlaces carbono-carbono simples y dobles. Por lo general se denomina cadena poliénica y es la que le va a aportar a la molécula su capacidad antioxidante. En la Fig 13 podemos ver las implicaciones biológicas de los carotenoides.*

Fig 13: *Propiedades físicas y químicas de los carotenoides (Burton 1989; Krinsky 1989; Palozza 1992)*



De los más de 600 carotenoides conocidos actualmente, aproximadamente 50 de ellos serían precursores de vitamina A basándonos en consideraciones estructurales. Los niveles óptimos como antioxidante de Vitamina A son de 80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ y la encontramos en zanahorias, espinacas, berro, brócoli, perejil, mango, melocotón, melón, pimiento rojo, tomate y plátano (Marquez 2002). La provitamina A más importante es el β -caroteno en términos de bioactividad. La Fig 14 muestra la estructura química del β -caroteno.

Fig 14: Estructura química del β -caroteno.



La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado ya que disipa la energía sin producir lesión celular; los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección (Foote 1970).

3.5.3: DEFENSAS SECUNDARIAS.

Ya que las defensas antioxidantes no son completamente efectivas en todo momento, se ha desarrollado un sistema de enzimas reparadoras que se encarga de rehabilitar las proteínas dañadas por los ROS, de extraer los ácidos grasos oxidados de los fosfolípidos y de reparar el

ADN alterado. Las moléculas excesivamente dañadas no se reparan para minimizar la introducción de mutaciones.

Las defensas secundarias incluyen:

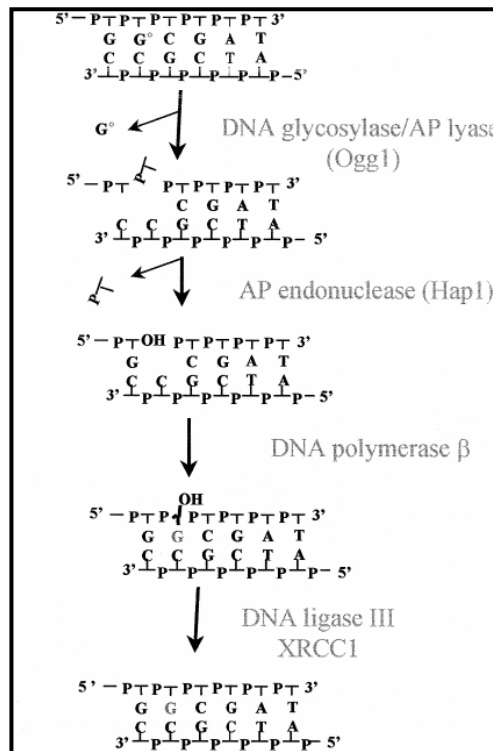
- *Enzimas lipofílicas (fosfolipasas), que serían las responsables de la reconstrucción de los constituyentes de la membrana dañados o alterados. La predilección de la fosfolipasa A₂ por los lípidos oxidados puede proporcionar a las células un mecanismo protector adicional contra la peroxidación lipídica.*
- *Las células poseen un sistema de enzimas con capacidad para reparar directamente los polipéptidos moderadamente dañados reconstituyendo su estructura. Uno de esos sistemas, muy abundante, es la reducción de los puentes disulfuro oxidados. Si las proteínas han sido dañadas de manera más grave, las enzimas proteolíticas (proteasas, peptidasas) las degradan en su mayoría, previniendo de esta manera su acumulación en la célula.*
- *Enzimas reparadoras del ADN. La mayoría de las células poseen diversos tipos de endonucleasas que específicamente reconocen diferentes modificaciones, provocadas por las ROS u otros agentes como la radiación ultravioleta. Otras enzimas reparadoras del ADN son la exonucleasa, ligasa y ADN glicosilasa; en esta investigación nos vamos a centrar en el estudio de la **OGG1** (8-oxoguanina glicosilasa 1) que minimiza la acumulación de la 8-oxo-dG (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina), base mutagénica más abundante derivada del*

ataque oxidativo al ADN y considerada como biomarcador del daño oxidativo en el ADN (Lunec 2001).

En humanos, el gen de la OGG1 se localiza en el cromosoma 3p25 y codifica 2 formas de proteína OGG1 que resultan del empalme alternativo de un único ARNm. La proteína α -OGG1 tiene localización nuclear mientras que la β -OGG1 es enviada a la mitocondria (Boiteux 2000).

El mecanismo de acción de la OGG1 en la excisión de la 8-oxo-dG se muestra en la Fig 15.

Fig 15: Mecanismo de excisión-reparación de la 8-oxo-dG en células de mamífero (Boiteux 2000).



3.6. ACCIONES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

Hay que tener en cuenta que, ni todas las acciones de los oxidantes tienen consecuencias perniciosas, ni todas las acciones antioxidantes tienen consecuencias beneficiosas. Nuestra biología está basada en reacciones redox, donde la oxidación y la reducción forman la base de nuestra capacidad para alimentar las reacciones de las que depende nuestra vida. Debido a que nuestras células están repletas de sustancias reductoras y oxidantes, debemos minimizar reacciones no deseadas mediante barreras cinéticas o compartimentación física. En caso de enfermedad o lesión celular, se pueden violar estas barreras (McCord 2002).

El oxígeno es la "fuente de la vida evolucionada" y, paradójicamente, también es un agente lesivo de gran importancia por ser la fuente más abundante de especies reactivas. Por lo tanto, las especies reactivas del oxígeno tienen una doble acción en los organismos vivos:

1. Beneficiosa: Participando en la defensa frente a las infecciones (Babior 1973; Babior 1978), fagocitosis e inflamación, generando potentes quimiotácticos y activadores de los neutrófilos, formando parte del metabolismo normal, particularmente en la respiración mitocondrial, detoxificación microsomal (inducción enzimática de muchos fármacos como los barbitúricos, etc.), regulación del tono del músculo liso, síntesis de eicosanoides, regulación de la permeabilidad y tono vascular, etc.

Las especies reactivas del oxígeno son moléculas que se producen con gran rapidez, muy reactivas, y tienen una vida muy corta (de nanosegundos a segundos) con un radio de difusión muy pequeño (de angstroms a micras). Están bien preparados para desempeñar el papel de segundos mensajeros en los sistemas rápidos de señalización celular que no requieren la síntesis de proteínas. Se sabe que las ROS actúan como moléculas transmisoras de señales en varios tipos celulares, participando y modificando eventos fisiológicos relacionados con la unión ligando-receptor y activación transcripcional. Regulan o participan en el crecimiento, apoptosis y en la respuesta adaptativa a la lesión o al estrés (Li 2002).

2. Dañina: Producidos en exceso lesionan estructuras y ocasionan daño tisular.

Las ROS se hallan a muy baja concentración en los seres vivos, y son tan inestables que apenas existen como tales durante poquísimos tiempo. Ya se ha comentado que su radio de acción es muy reducido, y a no ser que tengan una gran capacidad de difusión, acostumbran a agredir a las moléculas que tienen a su alrededor, al ser éstas las primeras con las que entran en contacto. Por ello las lesiones que producen las ROS tienden a compartimentarse. Pero, aunque inicialmente producen únicamente efectos locales, las especies reactivas secundarias a ellas y a la degradación de productos producidos en las reacciones en las que se

encuentran implicados, pueden tener efectos distantes al lugar donde se formaron.

Los mecanismos por los que las ROS producen lesión celular son complejos. Por su avidez en aceptar electrones, pueden actuar sobre cualquier molécula: ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos (sobre todo los poliinsaturados presentes en las membranas de las células) y los carbohidratos. La reacción inicial genera un segundo radical, el cual puede entonces reaccionar con otras moléculas provocando reacciones en cadena. Debido a que éstas son reacciones químicas espontáneas, las leyes de la termodinámica exigen que la ganancia energética al formarse un nuevo enlace molecular, ha de ser mayor que la energía de disociación del antiguo enlace (el radical que se ha formado ha de ser más estable que el antiguo). Una consecuencia de la formación de radicales más y más estables es que la progresión de la reacción en cadena se orienta cada vez más a enlaces "susceptibles", que requieran poca energía para ser disociados.

La interacción de las ROS con estas moléculas producirá una modificación estructural, que se traducirá en última instancia en una alteración funcional.

Lo malo no es que se generen ROS en el organismo, fenómeno que ocurre constantemente en situaciones normales, sino que exista un desequilibrio entre su producción y su eliminación. A este efecto que producen las ROS en los organismos vivos se ha denominado estrés oxidativo y no depende sólo de la agresividad química, sino también de la cantidad de estos y del

tiempo de exposición, así como del tipo de tejido que sufra el efecto, y de la eficacia de las defensas antioxidantes disponibles. Por tanto, para mantener la homeostasis se requiere una regeneración continua de la capacidad antioxidante.

Se pueden lesionar diversos tipos de estructuras diana, lo cual depende de la naturaleza del agente reactivo y de su lugar de generación. Como se apuntó previamente, una de las características de las ROS es la tendencia a generar reacciones en cadena, o sea la lesión de unas moléculas puede originar la de otras, lo cual da como resultado una amplificación en el efecto lesivo final.

3.6.1: Acciones sobre los lípidos: los lípidos de las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, ricos en grupos alquilo y cicloalquilo, los cuales son susceptibles de sufrir lesión oxidativa, durante la cual se pueden distinguir 3 fases: inicio, propagación y terminación (Gutteridge 1995).

El proceso se inicia cuando una ROS con suficiente reactividad, capta un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, dejando un electrón desapareado en un carbono de las cadenas laterales de los fosfolípidos de las membranas, las cuales se fragmentan justamente por el carbono que se ha transformado en radical libre (Fig 16).

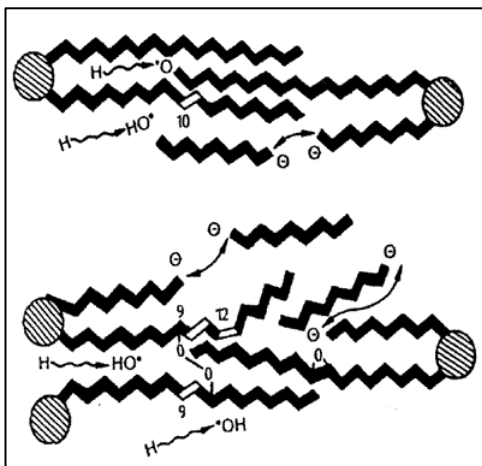


Fig 16: Representación esquemática del daño producido por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los trazos negros representan enlaces saturados; los blancos insaturados; los círculos, las bases. Los radicales libres se fijan en diversos puntos de las cadenas y las "puentean", las desorganizan y las rompen (López Alonso 1997).

Con ello las estructuras fosfolipídicas de las membranas se desorganizan y destruyen, afectando además de a la pared celular, las membranas citosólicas (mitocondrias, núcleo, etc) con la consiguiente pérdida de su funcionamiento y eventual ruptura, liberándose el contenido de las organelas y de la misma célula. La liberación de enzimas lisosómicas puede además potenciar el daño celular inducido por las ROS.

Durante la propagación, una serie de reacciones en cadena van produciendo sustancias tóxicas, que por sí mismas pueden capturar un átomo de hidrógeno de un ácido graso como el radical alcoxilo, radical peroxilo y productos α , β aldehídos insaturados como el malondialdehído (MDA), y el citotóxico y mutagénico 4-hidroxinonenal, principal producto de la peroxidación lipídica (proveniente de los hidroperóxidos lipídicos formados en la reducción de los radicales peroxilo, junto con los gases hidrocarburos etano y pentano), el cual a su vez puede lesionar por su

tendencia a reaccionar con grupos sulfhidrilo de las proteínas de membrana, inactivando receptores, transportadores y enzimas) (Grune 1994; Siems 1995). Un exceso de hidroperóxidos, por sí mismo ya interfiere en el funcionalismo de la membrana.

La presencia de metales de transición como el hierro o el cobre pueden catalizar la formación de compuestos iniciadores y acelerar la peroxidación lipídica. También se ha sugerido que durante la degradación de los compuestos derivados de la peroxidación lipídica se forma oxígeno singlete, el cual puede contribuir a la reacción en cadena.

Estas reacciones de propagación pueden continuar indefinidamente o pueden terminar por la intervención de un grupo de sustancias eliminadoras de radicales libres, algunas de las cuales son esenciales para la integridad celular, y pueden caer bajo la categoría general de defensas antioxidantes. Otros como el radical hidroperoxilo son radicales libres (Omar 1990).

3.6.2 Acciones sobre las proteínas (Wolf 1986; Davies 1987; Stadtman 1991; Barbara 1997; Berlett 1997; Grune 1997; Abu-Zidan 1999): *la susceptibilidad de las proteínas a la acción de las ROS depende de los aminoácidos que la componen, de la importancia y la localización de los aminoácidos susceptibles que median la conformación y actividad de la proteína, y de si el daño puede ser reparado. La localización celular de la*

proteína y la naturaleza de la amenaza también influye en la magnitud del daño.

Los aminoácidos, péptidos y moléculas de proteína, son susceptibles de sufrir el ataque de los ROS oxidando sus grupos sulfhidrilo. Además de alteración de las cadenas laterales de los aminoácidos, pueden producirse una serie de cambios físicos como la fragmentación de las cadenas polipeptídicas, agregación de las proteínas mediante enlaces cruzados covalente y no covalentemente a nivel tanto intra como intermolecular, y alteración de su conformación espacial que las hace muy susceptibles a la degradación proteolítica. La producción de grupos carbonilo impide el cumplimiento de algunas funciones como transporte iónico de membranas, receptores, mensajeros celulares, y enzimas reguladoras del metabolismo (Rodríguez 2001).

Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina (Freeman 1982). Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el O_2^- , que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo (Kono 1982). Por último, el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del O_2^- , también puede reducir el Cu^{++} de la superóxido dismutasa Cu-Zn a Cu^+ , reaccionando después con él y generando radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del

centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica (Hodgson 1975).

Finalmente, la reacción de las proteínas con las ROS puede dar lugar a subproductos que aumenten el daño inicial (Martínez 2001).

3.6.3 Acciones sobre los carbohidratos: Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas.

Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH para producir sustancias reactivas (Sies 1985; Blake 1987). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (Greenwald 1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

Paralelamente la glucosa se puede unir a las proteínas en el grupo amino terminal iniciando la glicación de las mismas dando productos altamente reactivos (productos de Amadori, de Maillard,...)(Wolf 1987).

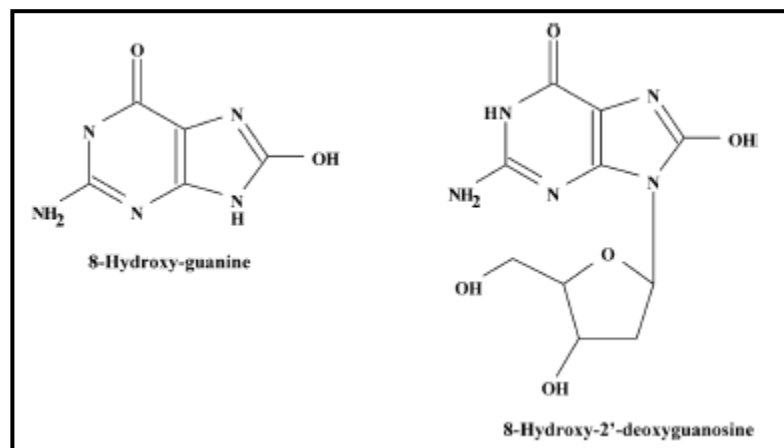
Tanto la autooxidación como la glicación de proteínas son reacciones extremadamente lentas (requieren días o semanas) y son responsables en gran medida de las interacciones glucosa-proteína, interacciones muy importantes pues la formación y detoxificación de las ROS están

moduladas por enzimas (SOD, Catalasa, GPx...), disminuyendo la acción de éstas y exagerando los efectos de aquellas.

3.6.4 Acciones sobre el ADN: Las ROS pueden producir alteraciones estructurales en el ADN, como la rotura de una o de las dos hebras y la alteración de las bases que la componen, produciendo la muerte celular y mutaciones. El peróxido de hidrógeno por su gran capacidad de difusión accedería al ADN, dañándolo directa e indirectamente a través de la formación de radical hidroxilo vía reacción de Fenton (Reacción 4) (Cochrane 1991).

De los subproductos inducidos por las ROS uno de los más característicos es la oxidación de bases de DNA tanto genómico como mitocondrial; y de entre todas las bases, tanto púricas como pirimidínicas, la más propensa a ser modificada es la guanina (Nakabeppu 2004); a su vez, la lesión oxidativa más y mejor estudiada durante mucho tiempo es la 8-hidroxiguanina (8-OH-Gua) y su equivalente 2'-deoxinucleósido, la 7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-OH-dG), cuyas estructuras moleculares se muestran en la Fig 17.

Fig 17: Estructuras de 8-OH-Gua y 8-OH-dG (Evans 2004).



En el ADN la 8-OH-Gua deriva de la adición de un radical hidroxilo (OH) a la guanina en la posición C8. La 8-OH-dG se considera como un importante biomarcador de generalización, de estrés oxidativo celular y producto de reparación en orina (Cooke 2000).

Una vez formada es sumamente importante que la 8-OH-dG no permanezca en el genoma. Los múltiples mecanismos de reparación conocidos para la eliminación de modificaciones oxidativas en el ADN se pueden dividir en dos mecanismos: BER (Base Excisión Reparación) y NER (Nucleótido Excisión Reparación). Al parecer, cuantitativamente, BER es la forma más importante de eliminación para la mayoría de lesiones oxidativas. La glicosilasa considerada como la principal responsable de eliminar la 8-OH-Gua en humanos es la 8-OH-Gua Glicosilasa (OGG1)(Rosenquist 1997); la encargada de prevenir la incorporación de deoxinucleótidos trifosfato modificados

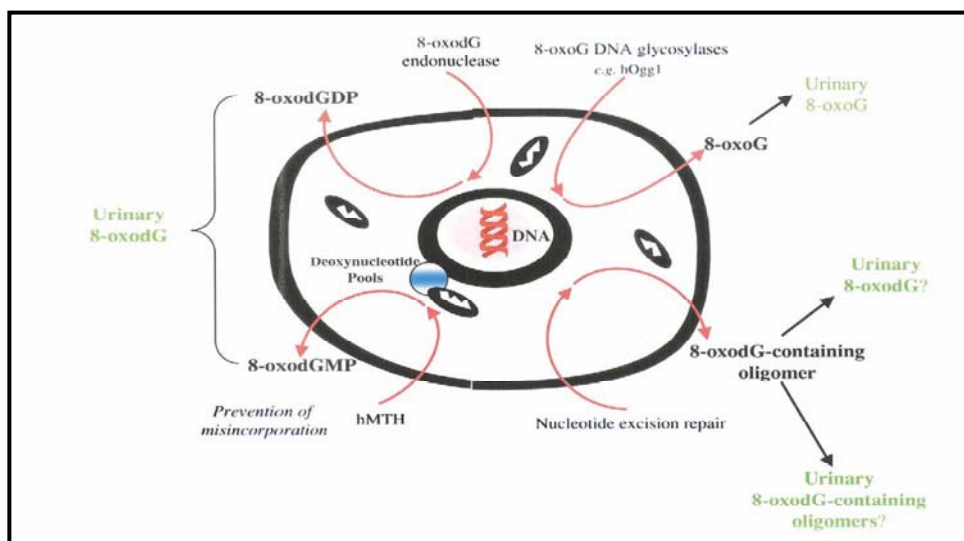
oxidativamente dGTP (8-oxodGTP) mediante la hidrólisis de éstos a monofosfato, dGMP, y por lo tanto, evitando su incorporación se conoce como 8-oxo-2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato pirofosfohidrolasa (8-oxod-GTPasa, hMTH1 en humanos) (Mo 1992; Bialkowski 1998).

Como acabamos de mencionar, el DNA en general, sufre procesos de reparación; los productos de lesión del DNA oxidado son fácilmente solubles en agua y son excretados por la orina; dentro de ellos incluimos bases libres, ribonucleósidos de RNA y deoxinucleósidos de DNA. Podemos recalcar que la excreción urinaria de los productos de reparación de DNA representa el rango promedio del daño oxidativo global en el organismo, mientras que los niveles de bases oxidadas en el DNA genómico in situ es una medida de la concentración en dicho tejido o tipo celular en el momento de extracción de la muestra (Cooke 2001).

En la Fig 18 podemos ver las posibles fuentes de 8-oxo-dG urinaria derivadas del ADN nuclear y mitocondrial y de las reservas de deoxinucleótidos según (Cooke 2000).

Fig 18: Fuentes de 8-oxo-dG urinaria (Cooke 2000).

Ilustración esquemática de las posibles fuentes de 8-oxo-dG urinaria, derivada desde el ADN nuclear, mitocondrial y del pool de nucleótidos.



4. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y PARED VASCULAR.

Existen diversos ROS que desempeñan un papel importante en la fisiología y fisiopatología vasculares. Los más importantes son el óxido nítrico (NO), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Griendling 2003). Los ROS están implicados en algunas funciones fundamentales de la pared arterial. El NO es un mediador crucial de la vasodilatación dependiente del endotelio, mientras que $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 intervienen en el crecimiento, diferenciación y apoptosis de las células musculares lisas (Umans 1995; Irani 2000). Por otra parte,

la peroxidación lipídica y nitración proteica inducidas por el ONOO⁻ son acontecimientos aterogénicos tempranos (Heinecke 2003). Cada uno de los ROS deriva de reacciones químicas o enzimáticas específicas; a su vez, las células mononucleares circulantes (linfo y monocitos) son productoras de ROS e interaccionan con la pared vascular participando activamente en la formación de la placa aterogénica, así como en el proceso de inflamación asociado a ella.

El NO se produce en las células endoteliales por la activación de la eNOS, pero los macrófagos y células musculares lisas pueden expresar NO sintetasa inducible y contribuir a la producción de NO. El NO además de su función vasodilatadora también participa en la agregación plaquetaria y en el mantenimiento del equilibrio entre el crecimiento y la diferenciación de las células musculares lisas. Diversas hormonas vasodilatadoras y fuerzas físicas pueden activar la enzima eNOS. La expresión de NO sintetasa inducible en macrófagos y células musculares lisas origina una elevación de las concentraciones de citoquinas que da lugar a una respuesta inflamatoria local. Además, en determinadas circunstancias la eNOS está desacoplada por déficit de un cofactor esencial, la tetrahidrobiopterina, y se produce $O_2^{\cdot-}$ en vez de NO. Es decir, las enzimas NO sintetasa son potenciales fuentes de NO y $O_2^{\cdot-}$ dependiendo de las circunstancias ambientales (Channon 2002; Fenster 2003; Harrison 2003).

Todas las células vasculares producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . El $O_2^{\cdot-}$ es el resultado de la reducción de un electrón del oxígeno por una variedad de oxidasas. Cuando el $O_2^{\cdot-}$ se produce en concierto con NO, ambos reaccionan rápidamente para dar lugar a la molécula altamente reactiva ONOO. El ONOO es un importante mediador de la oxidación lipídica, como la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), con importantes efectos proaterogénicos.

En ausencia de NO, el $O_2^{\cdot-}$ es rápidamente dismutado hacia un ROS más estable, H_2O_2 , por la superóxido dismutasa, para luego ser convertido en H_2O por la catalasa o glutatión peroxidasa (Channon 2002; Griendling 2003). Los efectos del $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en la función vascular dependen de la cantidad producida. Cuando se forman intracelularmente en pequeñas cantidades, pueden actuar como segundos mensajeros modulando la función de mecanismos bioquímicos que participan en procesos como el crecimiento de células musculares lisas o fibroblastos. Una elevada producción de ROS puede causar lesiones en el ADN, toxicidad celular y apoptosis, como se ha demostrado en células endoteliales y células musculares lisas (Griendling 2003). Además de la fuente mitocondrial de ROS, diversas enzimas pueden sintetizar $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , como la dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) o fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAPDH) oxidasas, cuya actividad puede verse modulada por diversos estímulos. Así, la angiotensina II, el factor de necrosis tumoral alfa, la trombina y el factor de crecimiento derivado de

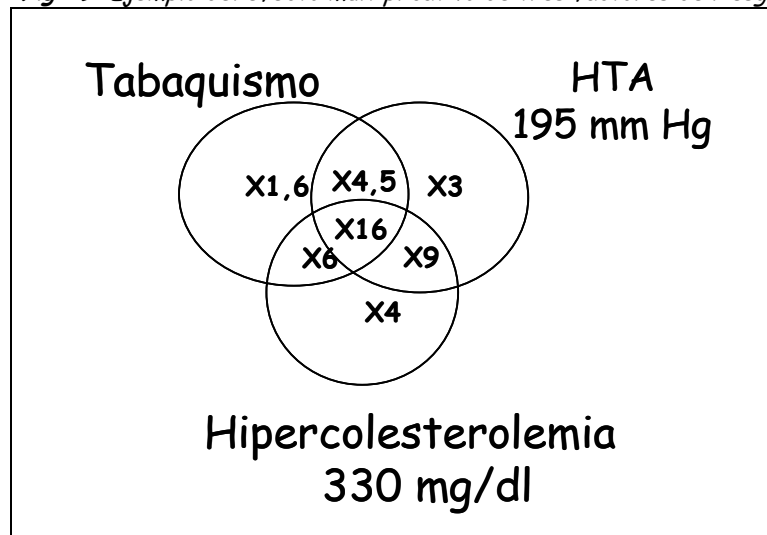
las plaquetas incrementan la actividad oxidasa y elevan las concentraciones de O_2^- y H_2O_2 en la células musculares lisas. Fuerzas físicas como los cambios de flujo son también potentes activadores de la producción de O_2^- en las células endoteliales (Griendling 2003; Harrison 2003) . Los macrófagos son la principal fuente vascular de O_2^- en situaciones patológicas. Oxidan las LDL a través de la activación de diversas enzimas. Los neutrófilos y monocitos pueden también secretar mieloperoxidasa, la cuál es importante en el inicio de la peroxidación lipídica (Griendling 2003; Heinecke 2003).

Los macrófagos también liberan al espacio extracelular ROS que pueden activar metaloproteinasas. Una vez activadas, las metaloproteinasas pueden degradar la matriz extracelular, debilitar la placa fibrosa de la placa de ateroma y facilitar su rotura (Heinecke 2003). Además, productos más estables de los ROS pueden influir en la función celular a través de sus acciones sobre mecanismos específicos, o bien actuando como ligandos para receptores nucleares y de membrana. Los ROS pueden modificar directamente la afinidad de ciertos factores de transcripción (NFK β o proteína activadora 1) para sus sitios de unión al ADN. Los ROS regulan diversas clases de genes , incluyendo moléculas de adhesión, factores quimiotácticos, enzimas antioxidantes y sustancias vasoactivas. Algunas de estas acciones son claramente una respuesta adaptativa como, por ejemplo, la inducción de las enzimas SOD y catalasa por H_2O_2 . La sobrerregulación de moléculas de adhesión y quimiotácticas

por mecanismos sensibles a oxidantes es de particular relevancia en las enfermedades vasculares. Estas moléculas promueven la adhesión y migración de monocitos hacia el interior de la pared. Por otra parte, el NO inhibe la inducción transcripcional de moléculas de adhesión por citoquinas. En conjunto estos mecanismos combinan la supresión de la expresión de moléculas de adhesión en la pared arterial normal y la inducción de su expresión en vasculopatías (Kunsch 1999; Griendling 2003).

5. FACTORES DE RIESGO DE LA ATEROSCLEROSIS: *factor de riesgo vascular es cualquier hábito o característica que sirve para predecir la probabilidad que tiene un individuo de desarrollar una enfermedad vascular. La existencia de un factor de riesgo no implica obligatoriamente una relación causa-efecto con la enfermedad. La presencia de varios factores de riesgo en un mismo individuo no aumenta su riesgo de forma aditiva si no multiplicativa (2003) como podemos ver en la figura 19.*

Fig 19: Ejemplo del efecto multiplicativo de tres factores de riesgo



Si bien todos los factores de riesgo favorecen el desarrollo de la enfermedad aterotrombótica en los diferentes lechos vasculares, su

poder predictivo es diferente para cada uno de los distintos territorios. Así el colesterol total tiene mayor poder predictivo para el territorio coronario, el tabaco para el vascular periférico y la HTA para el cerebral. Existen numerosos factores de riesgo que podemos clasificar en modificables o no, según la posibilidad de intervenir sobre ellos (Tabla 2). Debido al objetivo de este estudio me voy a centrar en los aspectos modificables y principalmente en los que suponen un mayor riesgo aterosclerótico, la hipertensión arterial y los trastornos del metabolismo lipídico (2003).

Tabla 2: Clasificación de los factores de riesgo

| |
|-------------------------|
| No modificables |
| Edad |
| Sexo |
| Antecedentes familiares |
| Herencia genética |
| Modificables |
| Hipertensión arterial |
| Hipercolesterolemia |
| Tabaquismo |
| Diabetes |
| Obesidad |
| Actividad física |
| Homocisteína elevada |

5.1 FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES.

5.1.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL: es un desorden hemodinámico que refleja la alteración entre el rendimiento cardíaco y las resistencias vasculares periféricas. En todas las formas establecidas de hipertensión las resistencias vasculares periféricas totales están aumentadas por múltiples factores como la disfunción del endotelio vascular que disminuye la producción de NO y prostaciclina I2, la elevación de los niveles plasmáticos de endotelina, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y aumento de la angiotensina II(AGT-II) circulante como mediador de la vasoconstricción, el incremento de catecolaminas y la viscosidad sanguínea, así como la disminución en número y calibre de las arteriolas (Rodríguez Perón 2002). Ha sido reconocida como uno de los factores aterogénicos fundamentales, independiente de la edad, el sexo o la raza y numerosos estudios confirman el beneficio consecuencia de la reducción de la presión sanguínea (Kannel 1976; O´Donnell 1997; Hansson 1999).

Las cifras de presión arterial, tanto sistólicas como diastólicas se correlacionan con la incidencia de enfermedad coronaria y de ictus. El riesgo aumenta de forma continua a lo largo del rango de presiones, de forma que los individuos con HTA límite o fronteriza tienen un riesgo algo superior al de los normotensos.

La hipertensión arterial se puede considerar como un estado de estrés oxidativo crónico, que puede contribuir al desarrollo de la aterosclerosis y daño en otros órganos relacionados. Una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), sumado a una caída de las actividades antioxidantes, se relaciona con las condiciones fisiopatológicas que dañan el sistema cardiovascular (Ferroni 2006).

En HTA también existe daño endotelial causado por el estrés oxidativo y por otros factores tales como, por ejemplo, el mayor efecto cizalla debido al aumento de presión arterial y de la viscosidad. En estas condiciones, se va a producir una mayor oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo que conlleva un aumento en el riesgo aterogénico. Por otra parte, este daño endotelial puede traducirse en una disminución de la producción o biodisponibilidad del NO endotelial y plaquetario y una mayor susceptibilidad a la formación de placas aterogénicas.

Nuestro grupo ha estudiado el estrés oxidativo en la hipertensión. En estos trabajos hemos observado que los pacientes hipertensos tienen aumentado el estrés oxidativo a nivel sistémico y que el tratamiento es capaz de reducirlo independientemente del método utilizado, farmacológico o dietético. (Sáez-Tormo 2004).

Existen múltiples causas conocidas de la hipertensión, algunas de las cuales elevan sólo la presión sistólica y otras las presiones sistólica y

diastólica a la vez. Sin embargo, el 95% de los pacientes hipertensos sufren la llamada hipertensión esencial o de causa desconocida. Este término engloba probablemente diversas formas de hipertensión que podrían ser identificadas en un futuro; aunque dichos pacientes presentan un mismo fenotipo, el origen de éste es diferente, ya que depende de la interacción tanto de factores genéticos como ambientales.

Es importante para esta investigación poder comparar los resultados oxidativos de los pacientes hipertensos en función de si estos han desarrollado o no síndrome metabólico, por lo que vamos a definir esta patología.

5.1.2. SÍNDROME METABÓLICO: podemos definir el síndrome metabólico como una condición patológica asociada a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que presenta un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. El National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) reconoce por primera vez que el síndrome metabólico condiciona un mayor riesgo de enfermedad coronaria y señala los criterios de diagnóstico que son muy simples y de fácil aplicación clínica como muestra la Tabla 3.

| SÍNDROME METABÓLICO . DIAGNÓSTICO SEGÚN EL NCEP – ATP III | | |
|---|--|--------------|
| 3 o más de los siguientes factores: | | |
| • Obesidad abdominal | | |
| CC(cm) Hombres | | > 102 |
| Mujeres | | > 88 |
| • Triglicéridos (mg/dl) | | ≥ 150 |
| • C-HDL (Mg/dl) | | |
| < 40 | | < 40 |
| Mujeres | | < 50 |
| • P.Arterial (mm Hg) | | ≥ 130 / ≥ 85 |
| • Glicemia (mg/dl) | | ≥ 110 |

Tabla 3: Diagnóstico del Síndrome Metabólico según el National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (JAMA 2001).

Patogenia (Fig 20) : La resistencia a la insulina se define como una condición caracterizada por una menor actividad biológica de la hormona que se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente en el metabolismo de la glucosa. Esto se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo, muscular y también en el endotelio. Un cierto grado de resistencia a la insulina es fisiológica durante la pubertad, en el embarazo y con el envejecimiento, siendo normalmente compensada por una mayor secreción de insulina por las células beta del páncreas.

La resistencia a la insulina patológica puede ser secundaria a defectos del receptor de insulina o por trastornos de su acción a nivel post-receptor (Shepherd 1999).

En la gran mayoría de los pacientes que tienen resistencia a la insulina, hay defectos a nivel post-receptor derivados de alteraciones genéticas, que son múltiples (sustrato del receptor de insulina-1 -IRS- 1, proteinkinasa, glicógeno sintetasa, etc), cuya expresión clínica es favorecida por la concurrencia de factores ambientales, entre los que destaca la obesidad torácicoabdominal.

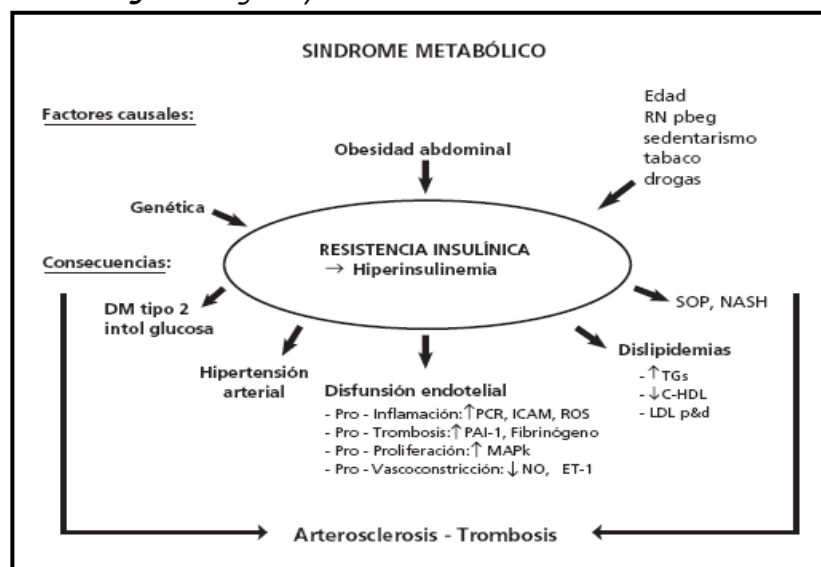
El sedentarismo, tabaquismo, algunos medicamentos (diuréticos, betabloqueadores, progestágenos, corticoides) también facilitan la resistencia a la insulina.

La obesidad es el principal factor patogénico y más del 80% de los obesos son insulino-resistentes. La expansión de los adipocitos viscerales modifica su actividad endocrino-metabólica con aumento de secreción y niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (AGL), del factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) y otras citoquinas pro-inflamatorias así como la disminución de la adiponectina. Los AGL generan resistencia a la insulina en el músculo al promover la fosforilación del IRS-1 en posición serina (en vez de en tirosina), lo que se traduce en menor traslocación de los transportadores de glucosa -GLUT-4- dependientes de la fosfatidilinositol-3-kinasa.

La menor utilización de la glucosa a nivel de adipocitos y células musculares, junto a una mayor producción hepática, por neoglucogenia,

son la causa de la hiperglicemia y de la hiperinsulinemia compensadora (Shepherd 1999).

Fig 20: Patogenia y consecuencias del síndrome metabólico.



(RNpbeg = Recién nacido con peso bajo para su edad gestacional; SOP = Síndrome de Ovario Poliquístico; NASH = Esteatohepatitis no alcohólica; PCR = Proteína C reactiva; ICAM = Moléculas de adhesión intercelular; ROS = Especies reactivas de Oxígeno; PAI - 1= Inhibidor del activador del plasminógeno-1; MAPk= Kinasas de proteínas mitogénicas activadas; NO = Óxido nítrico; ET-1 = Endotelina 1; TGs = Triglicéridos; C-HDL = Colesterol de HDL; LDL p&d = LDL pequeñas y densas)

Consecuencias fisiopatológicas cardiovasculares (Fig 21) : La resistencia a la insulina se asocia significativamente a reconocidos factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, la hipertensión arterial, la dislipidemia aterogénica y otros factores relacionados a la disfunción endotelial.

La resistencia a la insulina es el defecto más importante en la patogenia de la intolerancia a la glucosa y de la diabetes mellitus tipo 2. Cuando la

célula beta claudica en compensar la resistencia con hiperinsulinemia, se desarrolla la hiperglicemia postprandial y, posteriormente, la hiperglicemia de ayuno. La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia preceden por años a la aparición de la diabetes en una condición que se puede considerar como prediabetes y que clínicamente ya se puede diagnosticar como síndrome metabólico.

Haffner et al, demostraron en el estudio de San Antonio que el 82,4% de los individuos que desarrollaron diabetes eran previamente insulino-resistentes (Haffner 2000). En el estudio de Bruneck, Bonora et al encontraron insulino-resistencia evaluada por HOMA (Homeostasis Model Assessment) en el 60% de los hipertensos y en más del 80% de los individuos con aumento de triglicéridos (TGs) y C-HDL bajo (no hubo asociación con hipercolesterolemia) (Bonora 1998).

Esta dislipidemia, llamada dislipidemia aterogénica, se explica por un aumento de la síntesis hepática de triglicéridos (por la mayor disponibilidad de AGL e hiperinsulinemia), mayor secreción de lipoproteínas VLDL y mayor catabolismo de las HDL con aumento de la excreción renal de apoA1. Por una mayor actividad de la enzima intravascular Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP), las VLDL reciben colesterol esterificado desde las LDL y desde las HDL, transfiriéndoles, a su vez, triglicéridos. Las HDL y las LDL ricas en triglicéridos son sustrato de la lipasa intravascular hepática aumentando el catabolismo de las HDL, mientras las LDL se transforman en partículas más pequeñas y densas. Estas LDL pequeñas

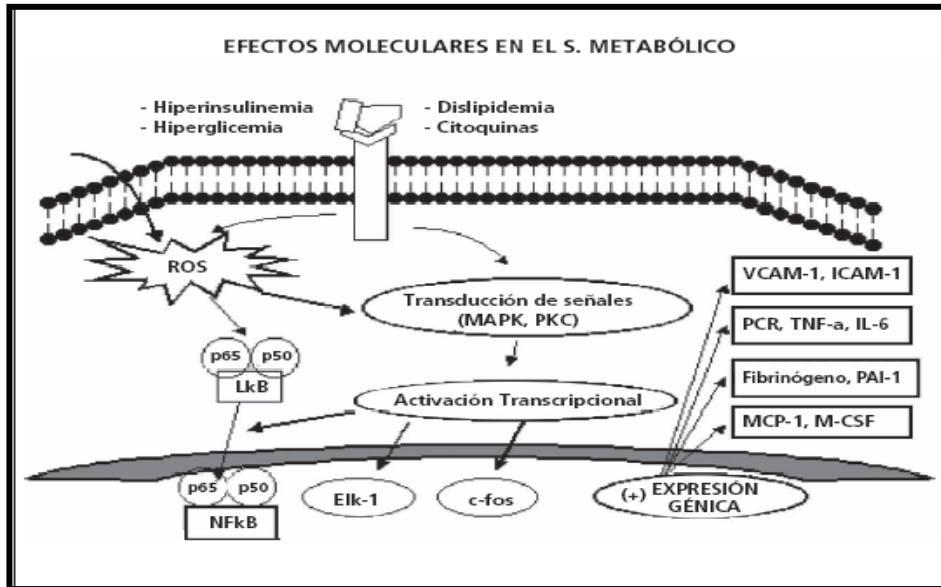
y densas son más aterogénicas porque son más susceptibles a la oxidación, siendo especialmente captadas por los receptores SR-A1 de los macrófagos del espacio subendotelial, generando una respuesta inflamatoria a medida que se transforman en células espumosas cargadas de colesterol. Además, la resistencia a la insulina reduce la actividad de la lipasa lipoproteica intravascular, reduciendo la remoción de IDL y remanentes de quilomicrones, que también son lipoproteínas aterogénicas.

En los últimos años, ha habido una extensa investigación sobre los efectos moleculares asociados a la resistencia a la insulina en la célula endotelial. Estos son múltiples y complejos, pero en conjunto producen un estado pro-inflamatorio y pro-trombótico que explicarían el incremento en el riesgo cardiovascular. Un elemento importante sería el aumento del estrés oxidativo por mayor producción de especies reactivas de oxígeno debido a la mayor oferta de AGL y de glucosa (cuando hay hiperglicemia), directamente o a través de la activación de factores de transcripción (Protein Kinasa C, MAP kinasas). La mayor actividad del factor nuclear NFkB (por disminución de su inhibidor) produce una mayor expresión de decenas de genes pro-inflamatorios.

Como consecuencia de ello, se producen múltiples cambios, como alteraciones del tono y flujo vascular (menor actividad de la óxido nítrico sintetasa -eNOS-, aumento de la endotelina-1), aumento de moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1), mayor permeabilidad vascular

(aumento de VEGF), menor fibrinólisis (aumento del PAI-1), mayor reclutamiento de monocitos (aumento de MCP-1), aumento de citoquinas (IL-6, TNF α) y proteína C reactiva (PCR) (Sonnenberg 2004; Dandona 2005).

Fig 21: Algunos efectos moleculares pro-inflamatorios, pro-proliferativos y pro-trombóticos del Síndrome Metabólico.



(ROS= Especies reactivas de oxígeno; IκB= Inhibidor del factor nuclear kapa B; NFκB= Factor nuclear kapa B; MAPK= Kinasas de proteínas mitogénicas activadas; PKC= Protein kinasa C; Elk-1= Factor de transcripción símil a ETS; c-fos= Factor de transcripción pro-crecimiento; VCAM-1= Molécula de adhesión de células vasculares; ICAM-1= Moléculas de adhesión intercelular; PCR= Proteína C reactiva; TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa; IL-6= Interleuquina 6; PAI-1= Inhibidor del activador del plasminógeno-1; MCP-1= Proteína quimiotáctica de monocitos)

5.1.3. TRANSTORNOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO: la asociación de hipercolesterolemia y aterogénesis está ampliamente comprobada en las hiperlipoproteinemias; con elevación de LDL se produce lesión en el endotelio sobre todo en aquellas zonas sometidas a flujos turbulentos. La superficie endotelial lesionada permite el paso del colesterol que interacciona con receptores específicos para la LDL en las células musculares lisas, especialmente en aquellas que migran hacia la íntima. Por otro lado, se ha observado en estudios epidemiológicos que las altas concentraciones de HDL en el plasma disminuyen la incidencia y progresión de la aterosclerosis. Las moléculas de HDL circulantes atraviesan fácilmente la pared arterial y pueden transportar partículas de colesterol fuera de las células musculares lisas.

Los mecanismos por los que se conduce al proceso ateromatoso son probablemente varios:

- a) Favoreciendo la lesión endotelial inicial*
- b) Promoviendo la acumulación lipídica y la progresión de la enfermedad*
- c) Estimulando la proliferación celular*
- d) Incrementando la reactividad plaquetaria y alterando la producción de prostaglandinas (Saini 2004).*

Es conocido que la hipercolesterolemia induce cambios fenotípicos en la microcirculación y esto es coherente con la existencia de estrés oxidativo y nitrosativo. Algunas funciones del endotelio vascular son influenciadas por el NO y la disfunción endotelial en los pacientes

hipercolesterolémicos se debe principalmente a la reducción de la biodisponibilidad del NO. Numerosos factores contribuyen a esto incluyendo el incremento en la inactivación del NO por los radicales y la inhibición de la producción de NO por diferentes mecanismos. Por otro lado, el anión superóxido (O_2^-), es generado por diferentes sistemas celulares y una vez formado participa en numerosas reacciones que producen nuevas especies reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Una vez que el EO está presente, se hacen presentes también características fisiopatológicas, tales como la activación plaquetaria y la peroxidación lipídica, que están directamente involucradas en el inicio y la progresión de la lesión aterosclerótica (Ferroni 2004).

*En el estudio de las hiperlipoproteinemias primarias nos hemos centrado en la **Hipercolesterolemia Familiar (HF)** y la **Hiperlipemia Familiar Combinada (HFC)**.*

*5.1.3.1. **HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF)**: enfermedad hereditaria, de transmisión autonómica dominante, debido a mutaciones del gen del receptor de las LDL (carencia de receptores, afinidad disminuída por las LDL o dificultades en los procesos de endocitosis de las LDL mediadas por el receptor) que provoca acumulación de las LDL en el plasma. Es la enfermedad monogénica más frecuente.*

Se caracteriza por la presencia de xantomas y xantelasmas asociados a la incidencia prematura de aterosclerosis, junto con colesterol en

plasma elevado, con HDL-colesterol y triglicéridos normales (Fig 18 y 19). Los pacientes heterocigotos suelen mantenerse asintomáticos hasta que presentan un accidente vascular coronario mientras que la forma homocigoto de hipercolesterolemia familiar es mucho más grave, con concentraciones de colesterol total mayores y con las manifestaciones aceleradas y a una edad más temprana.



Xantomas cutáneos

Xantomas Tendíneos



5.1.3.2. HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA: *enfermedad con transmisión autosómica dominante. Pueden presentar tres fenotipos distintos:*

- *elevación de LDL (hipercolesterolemia aislada, fenotipo IIA)*
- *elevación de VLDL (hipertrigliceridemia aislada, fenotipo IV)*
- *elevación de ambas lipoproteínas (hiperlipemia mixta o combinada, fenotipo IIB)*

Las concentraciones de HDL-colesterol son inferiores a las normales. Tiene gran importancia clínica ya que es la causa más frecuente de aterosclerosis prematura y está presente en el 10-20% de los pacientes con cardiopatía isquémica. Es frecuente la aparición de cardiopatía isquémica a edades tempranas y suele asociarse a obesidad, diabetes tipo 2, gota, hipertensión arterial y síndrome metabólico, con resistencia a la acción de la insulina y descenso del HDL-colesterol, que elevan el riesgo cardiovascular.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Los pacientes de las enfermedades con riesgo cardiovascular seleccionadas, hipertensión (HTA esencial), síndrome metabólico (SM) y dislipemias, hipercolesterolemia familiar (HF) e hiperlipemia familiar combinada (HFC), presentan niveles elevados de estrés oxidativo respecto a los individuos sanos. La base de este EO crónico de los modelos estudiados en las diferentes enfermedades puede ser distinto, originando además diferentes productos y diferente intensidad en su respuesta al EO. Esto hará que cada enfermedad con riesgo cardiovascular pueda presentar una respuesta distinta, con diferencias en marcadores, productos de EO, actividades enzimáticas y cuantificación de los genes que las codifican.

Este fenómeno origina una serie de respuestas celulares y sistémicas, mediados por numerosos metabolitos, proteínas, hormonas, etc. que pueden modular de diferente forma el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Además, el estrés oxidativo puede tener diferente origen y ocasionar diferentes productos en función de la enfermedad donde se presenta, la regulación de la respuesta podría ser diferente por lo que es interesante poder compararla entre los diferentes tipos de patologías seleccionadas.

La hipótesis de trabajo es la siguiente:

- *La existencia de estrés oxidativo en la sangre afecta a sus células circulantes, por lo que los niveles de los productos finales del EO así como la actividad y genética de determinadas proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo y el mantenimiento de su homeostasis principalmente, se verán afectados de distinta forma.*
- *Al comparar los niveles de actividades antioxidantes en las diferentes patologías cardiovasculares seleccionadas, así como los niveles de ARNm de las actividades antioxidantes, podremos analizar si la disminución de la defensa antioxidante se debe a una disminución en la expresión de dichas proteínas o al hecho de que sufran modificaciones post-transcripcionales. Consecuencia del diferente origen e intensidad del EO en estas enfermedades, su efecto y sus consecuencias serán distintas en cada una de ellas.*

OBJETIVOS.

En primer lugar debo de diferenciar los 2 objetivos principales de este estudio:

- *1º) Estudio para analizar el estrés oxidativo en el grupo control y los pacientes de hipertensión; dentro de los hipertensos analizaremos aquellos con y sin síndrome metabólico asociado, para ver el grado de implicación de la HTA y del SM en el estrés oxidativo presente en estos individuos.*

- *2º) Estudio comparativo del grado de estrés oxidativo entre las tres patologías de alto riesgo cardiovascular: HTA, HF y HFC.*

Dicho estudio comparativo se va a realizar mediante el análisis de los siguientes parámetros oxidativos tanto en plasma como en células circulantes:

- 1.- Estudio de los productos de oxidación, marcadores de EO y metabolitos relacionados.*
- 2.- Determinación de la actividad de los principales sistemas antioxidantes y prooxidante.*
- 3.- Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes que codifican dichas actividades enzimáticas.*
- 4.- Analizar comparativamente por patología cardiovascular los resultados anteriores en cada uno de los sistemas enzimáticos implicados.*

III: PACIENTES

1) RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y CONTROLES.

El reclutamiento de pacientes ha sido realizado por el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Universitario de Valencia, dirigido por el Dr. Redón, y el servicio de Endocrinología del mismo hospital, que dirige el Dr. Carmena. En ambos casos, se ha procedido a la extracción de 20-30 ml de sangre a cada paciente y a la recogida de orina estéril de primera hora de la mañana (en el caso de hipertensos y grupo control). Las determinaciones se han realizado en células mononucleares, plasma y orina de pacientes y de controles que reúnen los criterios de inclusión apropiados.

2) SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES.

En todos los casos se han empleado los criterios estandarizados de diagnóstico para cada enfermedad y se ha controlado si cada uno de ellos padecía alguna otra patología que pudiera interferir en este estudio.

PACIENTES DE HTA: *156 individuos cuyo criterio de selección fue: HTAe, PAS \leq 140 mm de Hg y/o PAD \leq 90 mm de Hg, de edades comprendidas entre 25-60 años y no tratados previamente de hipertensión esencial.*

Criterios de exclusión del estudio: Diabetes mellitus, glucosa sérica en ayunas >120 mg/dl, niveles de colesterol total >240 mg/dl y consumo de cigarrillos > 10 por día.

PACIENTES DE DISLIPEMIAS: *Pacientes HF y HFC (47) cuya inclusión en el estudio implica un historial familiar con herencia paterna dominante de una hiperlipidemia y los siguientes rangos de valores: Colesterol Total \geq 250 mg/dl (percentil 90) y/o TG \geq 150 mg/dl y ApoB \geq 129. Las edades de dichos pacientes están comprendidas entre 25-60 años.*

Criterios de exclusión del estudio: Ingesta de alcohol \geq 30 g/día; TSH \geq 10 mU/ml; colestasis; Creatinina > 2mg/dl o insuficiencia renal; IMC > 35 kg/m²; dieta hipocalórica; medicación que pueda modificar el perfil lipídico; embarazo y los 3 meses posteriores; cáncer; ataque al corazón, diabetes mellitus y enfermedad cardíaca.

A los pacientes dislipémicos no se les ha recogido alícuota de orina.

GRUPO CONTROL: *54 individuos sanos, normotensos y no fumadores que no tomaron medicación el día de la toma de muestra, de edades entre 25-60 años y con ausencia de historia familiar o personal de dislipemias o cardiopatía isquémica.*

3) ESTUDIO GENERAL DE LOS PACIENTES.

A todos los pacientes se les ha realizado una exploración física y su historial clínico, toma de medidas antropométricas y de presión arterial (PA) clínica y ambulatoria de 24 horas, según las recomendaciones de la British Hipertensión Society (Petrie JC 1986). Del mismo modo, también se ha estudiado su función renal, determinando la excreción urinaria de proteínas y la de albúmina, considerando que existe microalbuminuria cuando las dos determinaciones en orina de 24 horas sean igual o superior a 30mg/24 horas. Por último, se ha analizado también en cada uno de ellos la glucemia basal, ácido úrico y lípidos plasmáticos así como otros parámetros bioquímicos que se realizan en analíticas estándar.

4) ESTUDIO DEL GRUPO CONTROL.

De la misma manera que a los pacientes, a todos los individuos del grupo control se les ha realizado su historial clínico y una exploración física, toma de medidas antropométricas y de presión arterial (PA) clínica, estudios de su función renal además de la glucemia basal, ácido úrico y lípidos plasmáticos basales (colesterol total, LDL-colesterol y triglicéridos).

5) APARATOS.

- *Centrífugas: para las centrifugaciones a baja velocidad se ha utilizado una centrífuga refrigerada de la marca Eppendorf modelo 5702R. Las centrifugaciones a alta velocidad se han realizado en una ultracentrífuga refrigerada de la firma Jouan modelo MR1812.*
- *Espectrofotómetro: Ultrospec 3000pro de Amersham Biosciences.*
- *pHmetro: el pHmetro empleado es de la marca CRISON , modelo Microph , con un electrodo incorporado INGLOD.*
- *Baño termostatzado: con agitación automática regulable, marca Clifton, modelo Níkel electro LTD.*
- *Fluorímetro: SPECTRA MAX GEMINI XS.*
- *Balanzas: se han utilizado 2 tipos de balanzas, una de precisión GR-120 A&D (Instruments LTD) y una METTLER modelo PJ400.*
- *Agitador magnético: modelo ARE (VELT Scientifica).*
- *Sistema de depuración de agua: marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.*
- *Cromatógrafo líquido de alta eficacia: HPLC modelo 515 de Waters, Spherisorb columnas ODS de Waters, detectores electroquímico y ultravioleta (UV), electrodos coulométrico y amperométrico.*

- *RT-PCR a tiempo real: GeneAmp* PCR System 9700 Applied Biosystem y para el cuantitativo el modelo 9000HT de Applied Biosystem.*

IV: METODOLOGÍA

El procesamiento de las muestras, aislamiento de células mononucleares y de ácidos nucleicos así como todas las determinaciones de los parámetros bioquímicos se han realizado en la Unidad de Toxicología Metabólica que dirige el Dr. Guillermo Sáez Tormo, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia.

1) EXTRACCIÓN DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE LINFOCITOS, DNA Y RNA: La sangre fue extraída a las 8 de la mañana y en ayunas, como mínimo durante 8 horas, recogida en tubos heparinizados y conservada en frío para su inmediato procesamiento. La orina se recogió en frascos estériles y se almacenó a -20° hasta su procesamiento y análisis. Los perfiles bioquímicos séricos, que nos dan las características generales de los pacientes, fueron medidos por un autoanalizador.

De estas muestras de sangre se separa plasma y se aíslan células mononucleares, mediante centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma), seguido de tres lavados. Las células mononucleares resuspendidas en medio RPMI 1460 (Sigma) y las lisadas con el tampón de lisis "RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/Bone Marrow" (Roche) para la extracción de ARN, se conservan a -80°C hasta su uso.

El ADN genómico se aisló siguiendo el método Gupta (Gupta 1984), con las modificaciones descritas por Muñiz (Muniz, Valls et al. 1995), donde

la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) sustituye al fenol en la etapa de eliminación de proteínas.

La extracción del ARN se ha realizado siguiendo el método de extracción del guanidium thiocianato/fenol/ cloroformo como se describe en la referencia (Chomczynski and Sacchi 1987).

La cuantificación de ARN y ADN obtenidos de las extracciones se ha realizado mediante espectrofotometría, diluyendo la muestra 1/100 en tampón TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA) y midiendo la absorbancia de la dilución a dos longitudes de onda distintas:

260 nm: longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos.

280 nm: longitud de onda a la que se obtiene el pico de máxima absorbancia para las proteínas.

La relación entre las lecturas a 260nm y a 280nm nos sirve para determinar la pureza de la extracción. Si este cociente es superior a 1,8, la pureza de ADN y ARN se considera aceptable, si no es así la muestra es descartada.

Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \epsilon \times \text{factor de dilución.}$$

El coeficiente de extinción molar (ϵ) del ADN es 50 y del ARN 40.

Para la visualización de la extracción obtenida en cada muestra se prepara un gel de agarosa al 2.0% (peso:volumen) en tampón TBE con un

5. 10^4 % de bromuro de etidio, a un voltaje constante de 80V. Los resultados fueron fotografiados bajo iluminación UV.

2) ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO.

2.1) PARÁMETROS DE ESTUDIO

Para la valoración del estrés oxidativo se han determinado tanto los productos de oxidación molecular como los sistemas antioxidantes. En el primer grupo de parámetros se han seleccionado los marcadores más indicativos de estrés oxidativo como son el malondialdehído (MDA), la base nucleotídica modificada 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) tanto en el DNA genómico, como en el mitocondrial así como su eliminación por la orina, la relación GSSG/GSH, concentración de NO_3/NO_2 , determinación de proteínas carboniladas y la capacidad antioxidante total (PAO).

Del segundo grupo de parámetros se cuantificarán las actividades enzimáticas más representativas de la defensa antioxidante, como la Superóxido Dismutasa (SOD), encargada de la dismutación del radical superóxido (O_2^-), la Catalasa (Cat) que se encarga de la metabolización del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así como las actividades enzimáticas del sistema del glutatión, la Glutathion Peroxidasa (GPx) que metaboliza los peróxidos lipídicos (LOO \cdot) y la Glutathion Reductasa (GSR) que se encarga de la reducción del glutatión a expensas del NADPH. Como última actividad antioxidante hemos medido la tiorredoxina (TRX) que funciona básicamente del mismo modo que el GSH, siendo una pequeña y

multifuncional proteína que posee en su centro activo una secuencia altamente conservada con 2 residuos de Cys que catalizan reducciones tiol-disulfuro y que le implican en una enorme variedad de funciones biológicas incluyendo la citoprotección frente a EO.

Como sistema enzimático oxidante hemos estudiado la actividad de la Xantina Oxidasa (XO) que cataliza la síntesis de ácido úrico al mismo tiempo que produce radicales superóxido (O_2^-).

2.1.1) Determinación de los productos de oxidación.

2.1.1.1 Determinación de GSH, GSSG y MDA: *Los niveles de GSH, GSSG y MDA fueron medidos, tras su extracción, utilizando columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en células mononucleares aisladas mediante centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma). El contenido de glutatión reducido (GSH) de las células fue determinado con el método descrito en la referencia (Ursini, Maiorino et al. 1995) . Para el análisis del glutatión oxidado (GSSG), la muestras fueron tratadas con N-etilmaleimida y disulfonato de batofenantrolina, derivatizado y analizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describe por (Navarro, Obrador et al. 1997). Los niveles de MDA fueron analizados por HPLC, referencia (Halliwell 1980). La concentración de proteína fue cuantificada por el método Lowry (Higuchi and Yoshida 1977).*

2.1.1.2 Determinación de 8-oxo-deoxiguanosina en ADN genómico, mitocondrial y urinaria: El ADN aislado se lava 2 veces con etanol al 70%, almacenado a -20°C , se seca y se resuspende en $200\ \mu\text{L}$ de Tris 10 mM, 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl (pH 7.0) para su digestión enzimática. La primera digestión consiste en añadirle, a $200\ \mu\text{g}$ totales de ADN, 100 U de DNasa I en $40\ \mu\text{L}$ Tris 10 mM y $10\ \mu\text{L}$ de MgCl_2 0.5 M (concentración final de 20 mM) y se incuba 1 h a 37°C . En el siguiente paso, el pH de la mezcla de reacción se baja a 5.1 mediante la adición de $15\ \mu\text{L}$ de acetato sódico 0.5 M pH 5.1. Posteriormente, se añaden $10\ \mu\text{L}$ de nucleasa P1 (5 U) y $30\ \mu\text{L}$ de ZnSO_4 10 mM (concentración final de 1mM), y la mezcla fue incubada durante 1 h a 37°C . Después de neutralizar el pH de la mezcla de reacción con $100\ \mu\text{L}$ de Tris 0.4 M pH 7.8, se añaden $20\ \mu\text{L}$ de fosfatasa alcalina (3 U) y se incuba durante 30 minutos a 37°C . Las proteínas se precipitan con acetona (5 volúmenes), se desechan mediante centrifugación y el sobrenadante se seca por evaporación.

El **ADN mitocondrial** se aísla según el método descrito por (Latorre, Moya et al. 1986), usando $200\ \mu\text{L}$ de suspensión de células mononucleares tratadas con $200\ \mu\text{L}$ de acetato potásico 3M pH 4.8 y incubado a -20°C durante 20 minutos, para precipitar las moléculas de ADN de alto peso molecular y las proteínas. El ADN mitocondrial se extrae con un volumen equivalente de isopropanol y centrifugado durante 10 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se transfiere a un

nuevo tubo y se le añade un volumen equivalente de isopropanol; se conserva 5 minutos a temperatura ambiente y después de centrifugar 10 minutos a 13.000 rpm, el sedimento obtenido, que contiene el ADN mitocondrial, se lava con etanol frío al 70% y se almacena a -20°C hasta su utilización, resuspendido en $150\ \mu\text{L}$ de tampón Tris/EDTA a pH 8.

El ensayo de la 8-oxo-deoxiguanosina se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y siguiendo las condiciones descritas por (Frenkel, Zhong et al. 1991). El ADN hidrolizado se disuelve en agua grado HPLC y filtrada con una jeringa de $0.2\text{-}40\ \mu\text{m}$ antes de aplicar a la columna Waters ODS HPLC ($2.5\times 0.46\ \text{ID}$; $5\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula). La cantidad de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG) y la deoxiguanosina (dG) en el ADN digerido fue medido por detección de absorbancia UV y electroquímica. También hemos analizado patrones de dG y 8-oxo-dG para comprobar la correcta separación y poder identificar aquellas bases derivadas del ADN celular.

La concentración de dicha base se expresa como $8\text{-oxo-dG}/10^6\ \text{dG}$.

El ensayo de la **8-oxo-dG urinaria** se realiza sobre orina de la primera hora de la mañana que se recoge en botes estériles de polietileno; la orina es alicuotada y conservada a -80°C hasta el momento de su utilización. El método de detección de la 8-oxo-dG urinaria está basado en el método descrito por (Shigenaga and Ames 1991; Ronan K.Brown

1995). A 1 ml de orina se le añaden 100 μ L de 3M Tris- EDTA pH=8.6 y se mezcla vorteadando durante 30 segundos. La solución es aplicada sobre una columna Bond Elute C18 (OH)SPE (3 ml), previamente preparada con 3ml de metanol y 3 ml de agua. La columna será lavada con 3ml de agua seguidos de 3ml al 2.5% de acetonitrilo y 1.5% de metanol en 10mM de borato a pH= 7.9. La 8-oxo-dG es eluída con 2ml de tampón acetonitrilo/metanol en tampón borato, ajustado a pH 6 con 1M de HCl. 4 ml de 50:50 (diclorometano: propanol) es añadida a los 2 ml de eluído y vorteadado durante 30 segundos. La muestra es centrifugada 10 minutos a 4000 rpm y su fase acuosa evaporada por calor. Finalmente, la muestra es reconstituída en 100 μ L de agua de HPLC y 90 μ L de la solución es inyectado en la columna de HPLC.

Los valores de 8-oxo-dG son expresados en referencia a la concentración urinaria de creatinina como nmol 8-oxo-dG/mmoles creatinina.

DETERMINACIÓN DE LA CREATININA: se realiza con el kit comercial de SPINREACT (Cod N° 1001111) y necesitamos una dilución 1:10 (orina : agua). En cada cubeta se añade 1ml del reactivo comercial mezclado en la misma proporción (50% Hidróxido Sódico + 50% Ácido Pícrico) y 100 μ l de la orina diluída; la ABS se mide a 492nm a 30´´ y 60´´. Para calcular el blanco se añaden 100 μ l del estandar (2mg/dl) y se realiza la misma medida; el resultado expresado en mmol/ml se calcula según la siguiente fórmula:

$$[\text{CREATININA}] = \frac{\text{ABS m } 60'' - \text{ABS m } 30''}{\text{ABS bl } 60'' - \text{ABS bl } 30''} \times 2 \text{mg/dl} \times 88,4 (\mu\text{mol/l}) \times 10 (\text{FD}) \times 10^{-6} = \text{mmol/ml}$$

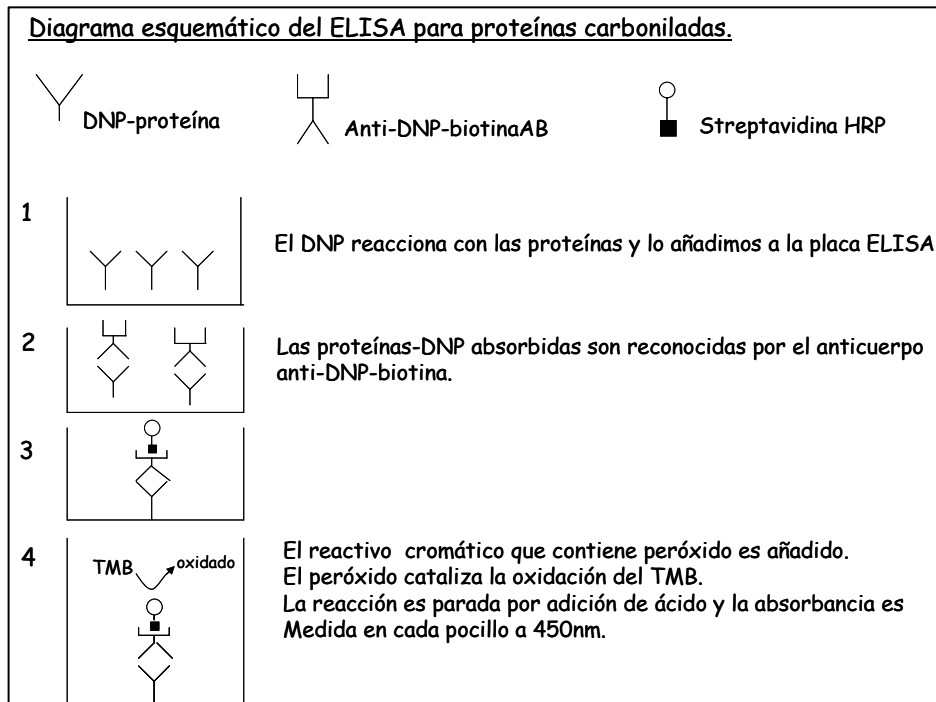
2.1.1.3 Determinación de proteínas carboniladas: *las proteínas carboniladas se forman por variados mecanismos oxidativos y son sensibles índices de daño oxidativo. La cuantificación de proteínas carboniladas en muestras biológicas puede ser determinada por derivatización con DNP (dinitrofenilhidrazina) y midiendo colorimétrica o inmunológicamente. El método ELISA permite la medida cuantitativa de carbonilación desde μg de proteínas (Buss, Chan et al. 1997).*

PRINCIPIOS DEL ENSAYO: el esquema del ELISA para las proteínas carboniladas se muestra en la Figura 1. Las muestras que contienen proteínas reaccionan con el DNP; entonces las proteínas se absorben inespecíficamente a la placa ELISA. El DNP no conjugado y los constituyentes no proteicos son lavados a continuación. Las proteínas adsorbidas son tratadas con un anticuerpo anti-DNP-biotina y completa el complejo la estreptavidina unida a peroxidasa de rabano (HRP).

Se añade el reactivo cromóforo que contiene peróxido y el peróxido cataliza la oxidación de TMB. La reacción es parada por adición de ácido y la absorbancia en cada pocillo se mide a 450nm.

Las absorbancias son relacionadas con una curva estándar de suero de albúmina con incremento en la proporción de ácido hipocloroso (que

oxida proteínas) y que ha sido calibrado colorímetricamente. El resultado se expresa en nmol/mg prot.



2.1.1.4 Determinación de PAO (poder antioxidante total): Los niveles de antioxidantes y la buena protección de los sistemas antioxidantes son muy importantes para prevenir el estrés oxidativo. Estos sistemas antioxidantes pueden ser: enzimáticos (aunque no exclusivamente de localización intracelular) y no enzimáticos (con intra y extracelular localización). Adicionalmente, se encuentran antioxidantes liposolubles (el más importante es la vitamina E) y antioxidantes hidrosolubles(ácido úrico, vitamina C, bilirrubina, tioles y

glutación). La cuantificación de estos antioxidantes es una importante herramienta en la valoración de los niveles y/o efectos del estrés oxidativo (Ceriello, Bortolotti et al. 1997; Santini, Marra et al. 1997; Allard, Aghdassi et al. 1998; Keith, Geranmayegan et al. 1998).

La evaluación de los niveles de antioxidantes en las muestras se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} por la acción de todos los antioxidantes presentes. La cantidad de Cu^{+} es evaluada mediante la medida del complejo formado por Cu^{+} y batocuprina (BC). Este complejo es estable y posee una absorción típica a 480-490 nm. Los valores obtenidos son comparados con una curva estándar obtenida con muestras de concentraciones conocidas de ácido úrico que utiliza al Cu^{2+} como único agente reductor.

Los resultados obtenidos se expresan en $\mu\text{mol/l}$ nivel antioxidante y la referencia del producto para la determinación del PAO es Deltaclon Oxistress, Cod: DEL 001.

2.1.1.5 Determinación de NO_3^-/NO_2^- : *El óxido nítrico (NO) juega un importante papel en la neurotransmisión, regulación vascular, respuesta inmune y apoptosis. La mayor parte del óxido nítrico (NO) es oxidado a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), las concentraciones de estos aniones han sido utilizadas para cuantificar la medida de la producción de NO. El kit de ensayo colorimétrico para Óxido Nítrico proporciona una medida exacta de la concentración total de nitratos/nitritos en un simple*

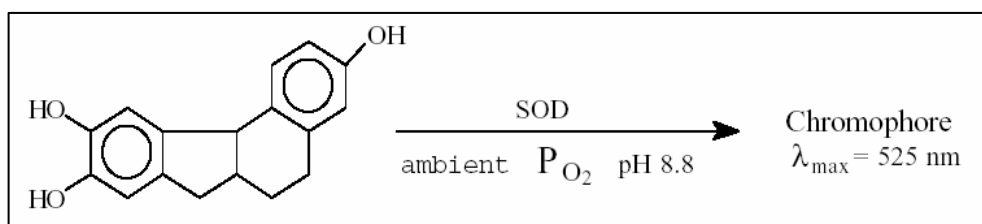
procedimiento de dos pasos. El primer paso es convertir los nitratos en nitritos utilizando la nitrato reductasa. El segundo paso supone la adición del reactivo Griess, el cuál convierte los nitritos en un compuesto color violeta. La medida de la absorbancia del cromóforo determina exactamente la producción total de óxido nítrico, que se expresa en μM .

La referencia del kit para la determinación de los niveles de óxido nítrico es BioVision Research Products, Catalog. #K262-200.

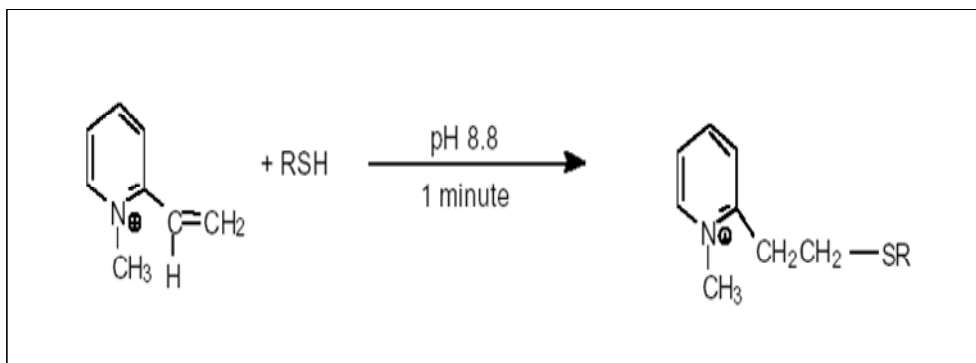
2.1.2) Determinación de actividades enzimáticas.

2.1.2.1 Determinación de la actividad Superóxido Dismutasa (SOD):

dicha actividad es calculada mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH SOD-525, N° CATALOGO 21010) cuyo método (Nebot, Moutet et al. 1993) se basa en el incremento del rango de autooxidación mediado por la SOD del R1= 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo(c)fluoreno en solución acuosa alcalina para producir un cromóforo con un máximo de absorbancia de 525nm. El cromóforo no ha sido aislado o caracterizado.



Las interferencias debidas a los grupos mercapto (RSH) como el glutatión reducido, es controlado por un pretratamiento de las muestras con R2=1-metil-2-vinylpiridinium, el cuál rápidamente elimina los grupos mercapto por medio de una rápida reacción de alquilación.

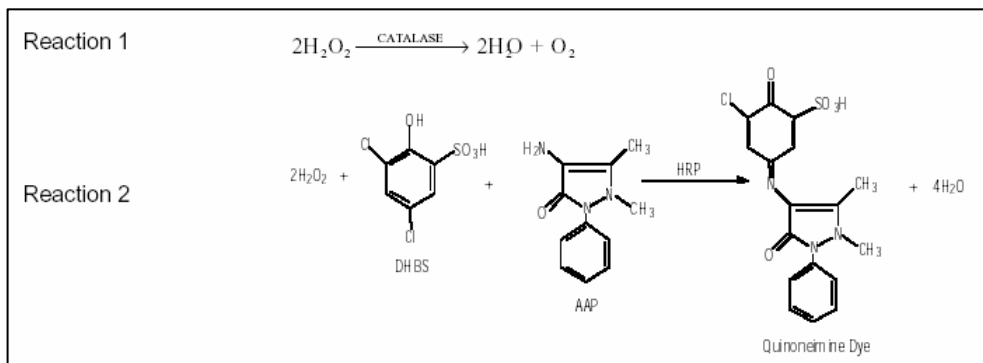


La medida cinética del cambio de absorbancia a 525nm se realiza después de la adición de R1. La actividad SOD es determinada desde el ratio de la velocidad de autooxidación en presencia (V_s) y en ausencia (V_c) de SOD. El ratio V_s/V_c como función de la actividad SOD es independiente del tipo de SOD (Cu-Zn SOD, Mn-SOD) que esté siendo medida (Nebot, Moutet et al. 1993). Una unidad de actividad de la SOD-525 se define como la actividad que dobla la velocidad de autooxidación del blanco control ($V_s/V_c=2$).

Para la inactivación de la Mn-SOD y que la medida sea específica para Cu-Zn SOD realizamos una extracción con etanol-cloroformo 62.5/37.5 (v/v).

La actividad SOD se expresa en U/mg prot.

2.1.2.2 Determinación de la actividad Catalasa (CAT): la determinación de la actividad Catalasa (EC 1.11.1.6, 2 H₂O₂ oxidoreductasa) se lleva a cabo mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH, Catalasa-520, n° Catálogo 21042). La medida espectrofotométrica directa de ésta actividad requiere mediciones en la región ultravioleta (Aebi 1984) donde puede interferir la absorción de proteínas y otros componentes de las muestras biológicas; el ensayo del OXIS Catalasa-520 utiliza la luz visible (520nm) reduciendo significativamente las interferencias de la muestra. El principio de la reacción tiene dos pasos, que voy a detallar a continuación, y se resume en las siguientes figuras:



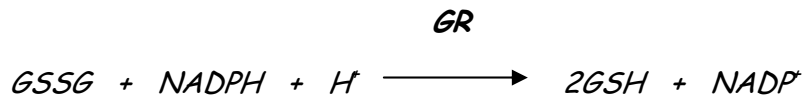
La velocidad de dismutación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a agua y oxígeno molecular (O₂) es proporcional a la concentración de catalasa (reacción 1). Por lo tanto, las muestras que contienen catalasa son incubadas en presencia de una concentración conocida de H₂O₂. Después de incubar exactamente un minuto, la reacción es parada con ácido sódica. La cantidad de H₂O₂ sobrante de la reacción es entonces

determinada por la reacción oxidativa de acoplamiento del 4-aminofenazona (4-aminoantipireno, AAP) y el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (DHBS) con la presencia de H_2O_2 y catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) como muestra la reacción 2 (Fossati, Prencipe et al. 1980). La quinoneimina coloreada resultante es medida a 520 nm (N-(4-antipyril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonemonoimina). La actividad Catalasa se expresa en U/g prot.

2.1.2.3.1 Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx) : la Glutación Peroxidasa celular (c-GPx, EC 1.11.1.9) es un miembro de la familia de las enzimas GPx cuya función es detoxificar peróxidos en la célula (Ursini, Maiorino et al. 1995). Las enzimas GPx catalizan la reducción de H_2O_2 hasta agua y los peróxidos orgánicos (R-O-O-H) hasta su correspondiente alcohol estable (R-O-H) usando glutación (GSH) como fuente de equivalentes de reducción.



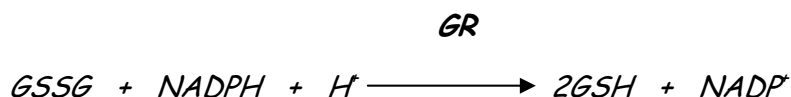
La determinación de la actividad GPx se lleva a cabo por medio de un ensayo colorimétrico (BIOXYTECH GPx-340, n° de catálogo 21017), el cual, es una medida indirecta de la actividad c-GPx (Paglia and Valentine 1967). El glutación oxidado (GSSG) produce la reducción de un peróxido orgánico gracias a la acción de la c-GPx y es reciclado al reducir su estado por la enzima glutación reductasa (GR).



La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340nm, para lo cual necesitamos un espectrofotómetro para que monitorice la actividad de la enzima GPx. El coeficiente de extinción molar del NADPH es 6220 M⁻¹cm⁻¹ a 340nm. Para el ensayo de la c-GPx, el homogenado celular es añadido a una solución que contiene glutatión, glutatión reductasa y NADPH. La reacción enzimática se inicia por la adición del sustrato, tert-butyl hidroperóxido y la absorbancia a 340nm es registrada. La velocidad de disminución en la A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad GPx en la muestra.

La actividad GPx se ha determinado en células mononucleares y los resultados se expresan en U/g proteínas.

2.1.2.4 Determinación de la actividad Glutation Reductasa (GR): la Glutation Reductasa (GR, EC 1.6.4.2) es una enzima distribuída ubicuamente y que cataliza la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida y activa (GSH).



El glutatión oxidado es reducido por una reacción de múltiples pasos en donde la GR es inicialmente reducida por NADPH formando una

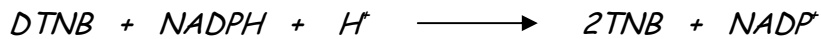
semiquinona de FAD, un radical sulfuro y un grupo tiol. La GR reducida (GR red) reacciona con una molécula de GSSG, resultando un intercambio disulfuro que produce una molécula de GSH y el complejo GR red-SG. Un electrón del complejo GR red-SG cambia de sitio en un segundo intercambio disulfuro, de manera que se recupera la segunda molécula de GSH y se restaura la forma oxidada de la GR (Massey and Williams 1965).

La determinación de la actividad GR se realiza mediante un ensayo espectrofotométrico (BIOXYTECH GR-340, n° de catálogo 21018D) y cuyo principio del ensayo se basa en la oxidación de NADPH a NADP⁺ catalizada por una concentración limitante de GR. Una unidad de actividad GR es definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un μmol de GSSG por minuto a pH 7.6 y 25°C. Como podemos observar en la reacción, una molécula de NADPH es consumida por cada molécula de GSSG reducida. De esta manera, la reducción de GSSG es determinada indirectamente por la medida del consumo de NADPH, como demuestra la disminución de la absorbancia a 340nm (A_{340}) en función del tiempo. El resultado se expresa en U/mg prot.

2.1.2.5 Determinación de la actividad Tiorredoxina (TRX): *La determinación de la actividad de la tiorredoxina se lleva a cabo por el método de reducción de la insulina (Holmgren and Bjornstedt 1995), en el que la actividad Trx-(SH)₂ es detectada por la capacidad de reducir*

puentes disulfuro de la insulina. El principio del ensayo está basado en la capacidad que tiene la tiorredoxina reductasa (TR) de reducir al 5,5´ ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) por el NADPH.

TR



El producto de la reacción, TNB (5´-ácido tionitrobenzoico) es amarillo y tiene un máximo de absorbancia a 412nm y un coeficiente de extinción molar de 13,600 cm⁻¹M⁻¹.

El homogenado celular es incubado durante 15 minutos con el tampón de activación (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 2 mM DTT). A continuación añadimos la mezcla de reacción (0.26M HEPES (pH=7.6), 10 mM EDTA 2 mM NADPH, 1 mM insulina, 100 nM TR) hasta un volumen final de 100µl e incubamos 20 min a 37°C. Después de dicha incubación la reacción se detiene por la adición de 500 µl del tampón de parada (6M guanidine- HCl, 0.2 M Tris-HCl pH= 8, 1 mM DTNB) y la absorbancia es medida a 412 nm.

La actividad de la tiorredoxina se calcula a partir de la ABS a 412nm como nmoles de grupos SH formados, usando la expresión (A 412x0.6/13.6), donde 13.6 es el coeficiente de extinción milimolar para el producto de la reacción de un grupo SH con DTNB. Hay que multiplicar por el factor de dilución (FD). El resultado se expresa como pmol THR/ mg proteína.

2.1.2..6 Determinación de la actividad Xantina Oxidasa (XO): Para la determinación en plasma de los niveles de xantina oxidasa usamos el ensayo basado en el reactivo Amplex Red (Molecular Probes, kit A-22182).

Este kit de ensayo proporciona un ultrasensible método para la detección de xantina/hipoxantina o para la monitorización de la actividad xantina oxidasa. En el ensayo, la xantina oxidasa cataliza la oxidación de las bases hipoxantina o xantina hasta ácido úrico y superóxido; en la reacción, el superóxido espontáneamente pasa a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el H_2O_2 , en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex Red para generar resorufina, producto oxidado fluorescente, que tiene un máximo de absorción y de emisión fluorescente aproximadamente a 563nm y 587nm, respectivamente; debido a que su coeficiente de extinción molar es alto ($54,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) el ensayo puede ser realizado por cualquiera de las dos métodos, fluorométrica o espectrofotométricamente.

Se prepara una curva estándar de xantina oxidasa: la solución stock de xantina oxidasa (10 U/ml) es diluída hasta conseguir concentraciones de xantina oxidasa de 1 a 10 mU/ml. Cada reacción (curva estándar y muestras de plasma) contiene 50 μM de reactivo Amplex Red, 0.2 U/mL HRP, 0.1 mM hipoxantina y la cantidad indicada de xantina oxidasa en

tampón de reacción 1X (sólo estándares) Las reacciones son incubadas a 37°C. Después de 30 minutos, la fluorescencia es medida en una microplaca de fluorescencia usando como longitud de onda de excitación 530 ± 12.5 nm y longitud de onda de fluorescencia de 590 ± 17.5 nm (Trujillo, Alvarez et al. 1998).

La actividad XO se expresa como mU/ml.

3) ESTUDIO GENÉTICO.

El estudio genético a los pacientes del estudio se ha realizado en el Laboratorio de Estudios Genéticos que dirige el Dr. Javier Chaves en la Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia.

3.1) ESTUDIO DE LOS NIVELES DE ARNm DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE Y LA REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO AL DNA.

A todos los pacientes seleccionados de las patologías sometidas a estudio así como al grupo control se les ha realizado un estudio en linfocitos de la expresión de varios de los genes que intervienen en los sistemas de protección antioxidante así como del gen de la OGG1, que codifica una glicosilasa que se encarga de la eliminación de la 8-oxo-dG y el de la G6PDH.

El contenido en RNA de las muestras de pacientes y controles, así como la pureza de éste fueron determinados mediante medida de absorbancia de 260 y 280nm. Para la retrotranscripción de los ARNm, se ha utilizado el kit "First Strand cDNA synthesis" de Amersham Biosciences.

La cuantificación de la expresión de ARNm de los diferentes genes estudiados se ha llevado a cabo mediante PCR a tiempo real, utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes estudiados. En la Tabla 1 se muestran dichas secuencias nucleotídicas así como las condiciones de cuantificación que se han usado en cada uno de ellos. La detección de ARNm se ha llevado a cabo mediante la medida de la unión del SYBR Green a la doble cadena de ADN y utilizando el sistema "7700 Sequence Detection System" de Applied Biosystems. La expresión de la GAPDH se ha usado como control interno.

Tabla 1 (*) S: sentido; AS: antisentido

| GEN | Nº GEN BANK | CONDICIONES | CEBADORES (*) |
|-------------------|-------------|-------------------|--|
| <i>Catalasa</i> | NM_001752 | 40 ciclos 60°C | S:5' - agatggtaactgggatctcgttgg-3' A: 5' - tcaggacgtaggctccagaagtc-3' |
| <i>SOD(Cu-Zn)</i> | NM_005125 | 40 ciclos 60°C | S:5' -aatgtccgtgctgatgctgac -3' A:5' -ggagttccctgtgatcttggataag-3' |
| <i>GPx 1</i> | NM_201397 | 40 ciclos 60°C | S:5' -tcgtttcctttctgttgctcgtag -3' A:5' -acaggagagaagggcagctagaac-3' |
| <i>GSR</i> | NM_000637 | 40 ciclos 60°C | S:5' -tgatcatgctgattatggctttcc-3' A: 5' - ctattgtgggcttgggatcactc-3 |
| <i>OGG1</i> | NM_016820 | 40 ciclos 62°C | S:5' -cagaccaacaaggaactgggaac-3' A: 5' - aagtgcttgggaatttctttg-3 |
| <i>G6PDH</i> | NM_004285 | 40 ciclos 60°C | S:5' - tctggatcatgtttctgtgctctg -3' A:5' - gcaggcatctgtaagttccattg -3 |
| <i>GAPDH</i> | NM_002046 | 40 ciclos 60°C | S:5' -tgacaactttggtatcgtggaagg -3' A:5' - gttcagctcagggatgaccttg -3 |

BREVE DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO: los productos de PCR son detectados por fluorescencia en un sistema termociclador (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems, USA) que detecta secuencias fluorescentes capaces de intercalarse con el ADN o unirse a él. El termociclador está adaptado a un láser, dirigido por cables de fibra óptica, a cada uno de los 96 pocillos donde

transcurre la reacción. La emisión de fluorescencia viaja a través de los cables a una cámara (CCD) con capacidad para detectar y monitorizar secuencias diana en tiempo real. Utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativo, existen dos métodos para detectar el ADN: uno es mediante una sonda marcada fluorescente, con un marcador y un apantallador que alinean específicamente entre los oligonucleótidos mensajero (m) y complementario (c). Cuando la sonda es cortada por la actividad nucleasa 5' de la ADN polimerasa, el marcador emisor de fluorescencia (reporter) es separado del apantallador de la misma (quencher), generándose así una señal que es específica de la secuencia. Con cada ciclo las moléculas emisoras son sucesivamente cortadas y separadas de sus respectivas sondas y la fluorescencia es monitorizada durante la reacción de PCR.

El otro método consiste en la capacidad que tienen ciertas moléculas para unirse al ADN, como es la molécula SYBR® Green I. El mecanismo por el cual esta molécula se une al ADN es conocido, uniéndose al surco mayor; se sabe que la fluorescencia se ve incrementada cuando está unido al ADN de doble cadena y que no inhibe la reacción de PCR. En nuestros experimentos hemos utilizado la molécula SYBR® Green I para cuantificar la cantidad de producto amplificado. Existe una relación cuantitativa entre la cantidad de secuencia diana inicial y la cantidad de producto de PCR amplificado en cada ciclo: en los ciclos iniciales de la reacción, no se observan cambios en la fluorescencia y esto define la señal basal o el umbral de fluorescencia. Un incremento de

fluorescencia por encima de ésta basal, indica la detección del producto de PCR acumulado.

La cuantificación de los resultados obtenidos se refieren a rectas patrón, para evitar interferencias intraensayo y para normalizar los valores de la cantidad de producto amplificado de los diferentes genes, se amplificó sobre las mismas muestras un fragmento del mensajero del gen del enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenada (GAPDH). La utilización del gen GAPDH tiene como fin conseguir una referencia endógena de las posibles variaciones en la eficiencia de la reacción de la transcriptasa reversa en las diferentes muestras.

El cálculo de los valores de los ciclos umbral y las cantidades a las que corresponde, los parámetros de la regresión lineal de la curva estándar, así como la pendiente y el coeficiente de correlación, lo realiza el programa del termociclador. Con estos valores podemos conocer la cantidad de producto amplificado y normalizar los valores de nuestro gen de interés, comparándolos con el gen de referencia GAPDH.

4) METODOLOGÍA ESTADÍSTICA Y SOPORTE INFORMÁTICO.

Para efectuar el análisis de datos y el cálculo de resultados estadísticos se han utilizado los programas informáticos Excel XP y SPSS para Windows versión 12.0. En los contrastes de hipótesis que se han efectuado, el nivel de significación que hemos considerado para la aceptación de la hipótesis nula ha sido 0,05 que es el valor más comúnmente aceptado por la comunidad científica (Cuadras, Echevarría et al. 1991; Milton 1998; Pardo Merino and Ruiz Díaz 2000).

Además de los estadísticos descriptivos habituales (media aritmética, mediana, desviación típica, varianza, valor máximo, valor mínimo, etc.) y del análisis de regresión lineal, se han utilizado las siguientes pruebas y contrastes de hipótesis (Cuadras, Echevarría et al. 1991; Milton 1998; Pardo Merino and Ruiz Díaz 2000; Ferrán Aranaz 2001)

Prueba de normalidad: prueba de Kolmogorov-Smirnov.

- *Análisis de correlaciones bivariadas:*
 - *Correlaciones paramétricas: coeficiente de correlación de Pearson.*
 - *Correlaciones no paramétricas: Tau-b de Kendall.*

- *Contrastes paramétricos sobre igualdad de medias:*
 - *Para el caso de comparación de medias de dos grupos: prueba T de Student para muestras independientes.*
 - *Para más de dos grupos: ANOVA de un factor, con el contraste post hoc de la Diferencia Honestamente Significativa (HDS) de Tukey.*

RESULTADOS

1) ANÁLISIS DEL GRUPO CONTROL Y LOS PACIENTES DE HIPERTENSIÓN. EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL EO CON LA PRESENCIA O NO DE SÍNDROME METABÓLICO.

1.1) CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

El estudio ha sido llevado a cabo en 165 pacientes de hipertensión arterial esencial, diagnosticados o no con síndrome metabólico, y 54 individuos sanos. Las características generales de dichas poblaciones, así como la significación estadística entre ambos grupos, se muestran en la Tabla 1.

Es importante resaltar sobre los datos que nos ofrece la Tabla 1, que el número de pacientes y controles masculinos supera en todos los casos al de las mujeres, siendo muy similares los valores de la media de edad en cada uno de los grupos. El índice de masa corporal (kg/m^2) y la glucosa basal (mg/dl) se presentan elevados en el grupo HTA respecto del control, al igual que los valores de presión sanguínea, pero en este caso, existe significación estadística entre los valores de ambos grupos.

Se muestran en la tabla los valores de excreción urinaria de albúmina (UEA) en los pacientes de HTA y consideramos existencia de microalbuminuria (daño renal) en el paciente cuando las dos determinaciones en orina de 24h sea igual o superior a 30 $\text{mg}/24\text{h}$. Los valores de colesterol total (mg/dl) y triglicéridos (mg/dl) son

ligeramente inferiores en el grupo control respecto de HTA, mientras que los de colesterol HDL (mg/dl) aumentan ligeramente en el grupo control.

Si nos centramos en la clasificación de los pacientes de HTA según el diagnóstico de síndrome metabólico, cabe destacar la diferencia de valores en la glucosa basal (mg/dl) entre los pacientes con y sin síndrome metabólico, presentando los primeros valores muy superiores. Del mismo modo se comporta la excreción urinaria de albúmina, de manera que el grupo SM presenta microalbuminuria, con valores superiores a 30mg/24h, mientras que el grupo NO SM no presenta daño renal.

Respecto a los otros parámetros que determinan el diagnóstico del síndrome metabólico, el colesterol HDL (mg/dl), los triglicéridos (mg/dl) y el colesterol total (mg/dl) presentan valores elevados respecto del grupo NO SM.

Tabla 1: Características generales de la población de estudio.

| | CONTROLES n=54 | p | HTA n=165 | SM n= 94 | NO SM n=71 |
|--|-------------------|--------|--------------|---------------|---------------|
| Edad | 46,2 ± 10,3 | NS | 43,1±11,0 | 43,25 ± 10,32 | 48,58 ± 10,22 |
| Sexo (H/M) | 34 / 20 | NS | 88/67 | 54 / 40 | 41 / 30 |
| Índice de masa corporal (kg/m ²) | 27,1 ± 3,1 | NS | 29,5 ± 3,1 | 31,92 ± 3,36 | 27,62± 4,10 |
| SBP, mm Hg | 129,6 ± 10,0 | <0,001 | 162.5 ± 3.5 | 160,5 ± 2,11 | 152,54 ± 1,6 |
| DBP, mm Hg | 79,1 ± 6,2 | <0,001 | 101.3 ± 2.2 | 99,8 ± 1,3 | 94,2 ± 2,1 |
| Glucosa basal (mg/dL) | 100,3 ± 9,8 | NS | 102,9 ± 10,6 | 107,8 ± 20,9 | 98,5 ±9,4 |
| MALB (UEA) | | | 61,99 ± 384 | 34,82 ± 117,6 | 25,42 ± 43,9 |
| Colesterol total (mg/dL) | 206,3 ± 33,1 | NS | 210,0 ± 29,8 | 221,3 ± 47,9 | 207,4 ± 41,9 |
| Colesterol HDL (mg/dL) | 47,5 ± 9,9 | NS | 45,6 ± 9,4 | 49,2 ± 10 | 40,2 ±10 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 121,0 ± 43,2 | NS | 138.7 ± 68.2 | 190 ± 90,1 | 115 ±51 |
| Fumadores | 0 | | 3 | 1 | 2 |
| Menopausicas | 0 | | 2 | 1 | 1 |

- Valores expresados como media ± desviación estándar.

- Valores de presión sanguínea expresados como media ± error estándar ajustado por edad y sexo.

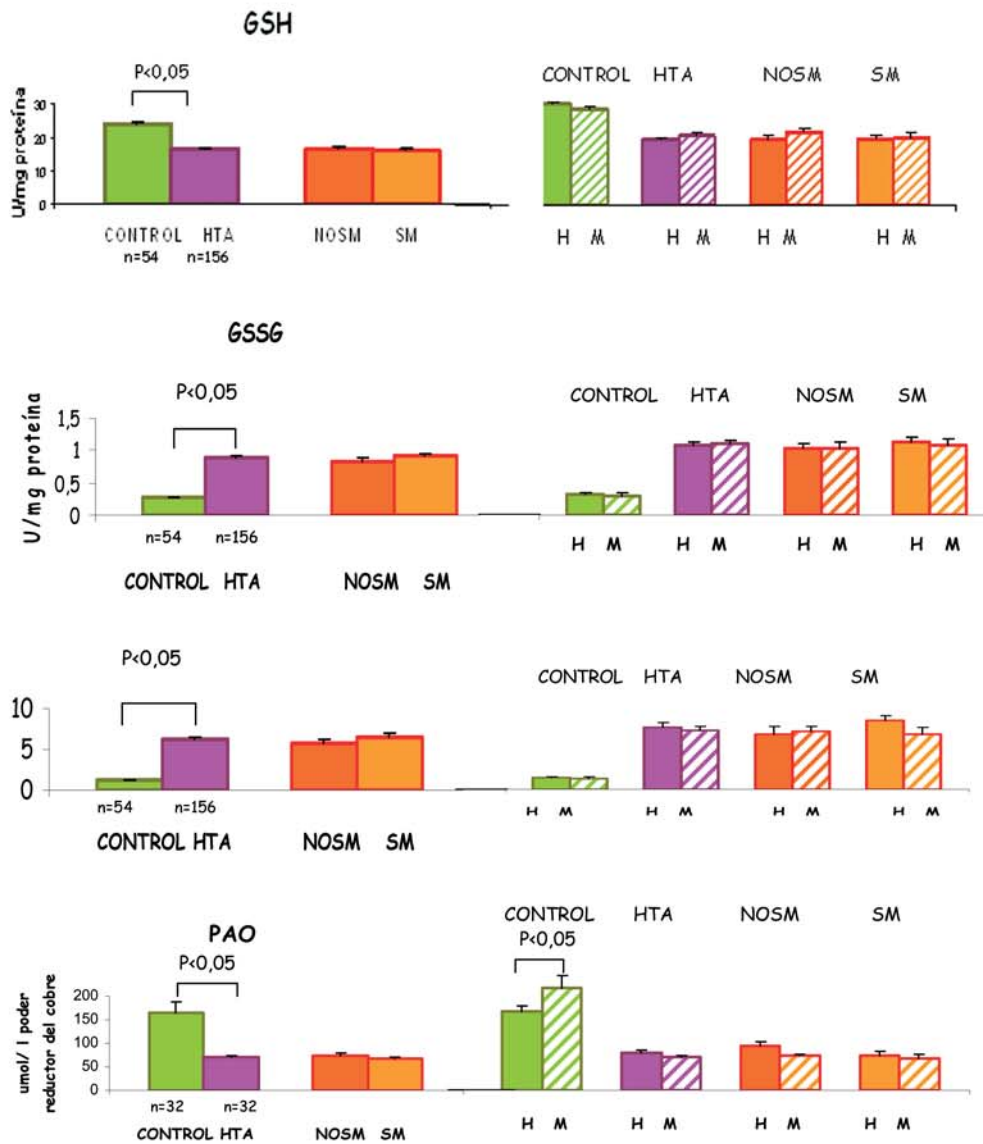
1.2) ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN, MARCADORES DE EO Y METABOLITOS RELACIONADOS.

El estudio en estos pacientes se ha llevado a cabo en células mononucleares, plasma y orina. El número de determinaciones realizadas a estos dos grupos es mayor debido a la disponibilidad de muestra de orina, así como de un mayor volumen inicial de muestra sanguínea.

En cada una de esas gráficas se presentan conjuntamente las comparaciones entre grupo control e hipertensión y entre los pacientes con asociación o no al síndrome metabólico, junto a su nivel de significación estadístico. A la derecha de las gráficas se representan cada uno de los grupos diferenciados por sexos.

Como índice de estrés oxidativo de las células sanguíneas circulantes del organismo se presentan los valores obtenidos en células mononucleares para el glutatión reducido, oxidado y el cociente entre ambos (que nos dará el estado redox de la célula), así como para el PAO medido en plasma en cada uno de los grupos seleccionados.

Fig 1: Niveles del estado redox celular y del PAO plasmático.

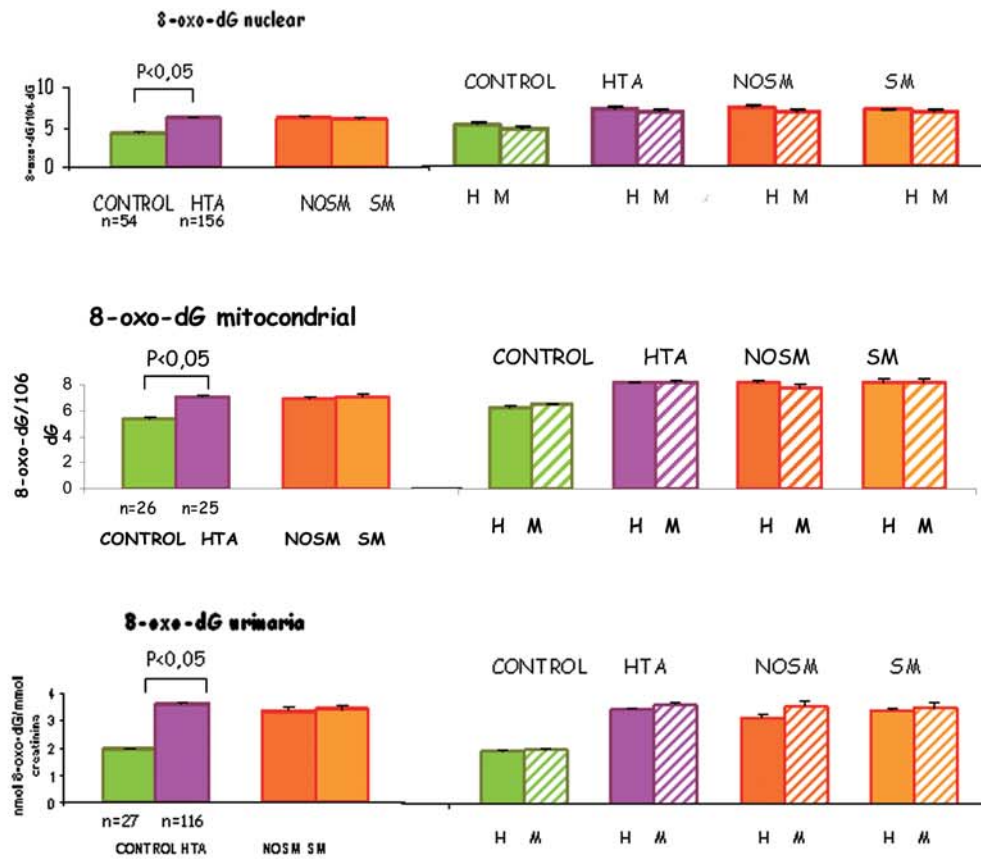


Valores expresados como media ± error estándar.

Como se observa en la Fig 1, los cuatro parámetros estudiados presentan significación estadística entre el grupo control y HTA, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los hipertensos diagnosticados con y sin síndrome metabólico. Respecto a la diferenciación entre sexos de los resultados, sólo el PAO en el grupo control presenta significación estadística entre hombres y mujeres, siendo mayor la cuantificación obtenida en las mujeres.

Los resultados del estudio de los productos de oxidación derivados del estrés oxidativo se presentan dependiendo de la molécula de la que derivan. De este modo, de la modificación oxidativa al ADN vemos los valores en la Fig 2 de la 8-oxo-dG nuclear, mitocondrial y su tasa de excreción urinaria. En los tres parámetros se repite la significación estadística entre grupo control y HTA, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la asociación al síndrome metabólico. El análisis de los resultados según el sexo de los pacientes no revela diferencias entre ambos sexos.

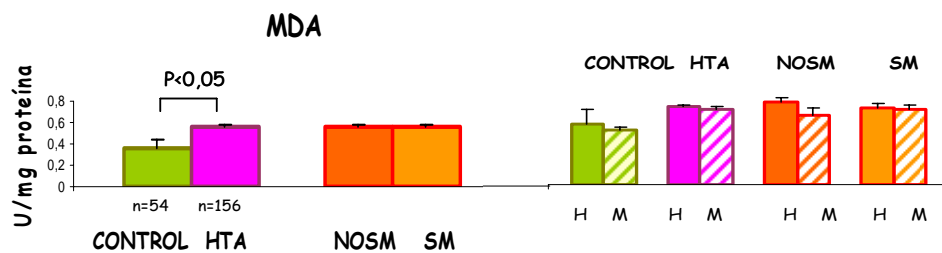
Fig 2: Niveles de 8-oxo-dG.



Valores expresados como media ± error estandar.

Como derivado de la peroxidación lipídica se presenta en la Fig 3 los valores de MDA; el MDA presenta significación estadística entre los grupos control y HTA; entre hombres y mujeres de las cuatro patologías no hay diferencias.

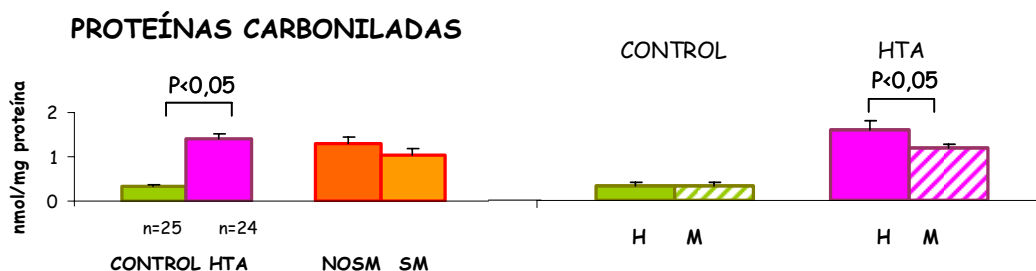
Fig 3: Productos derivados de la peroxidación lipídica.



Valores expresados como media \pm error estándar.

En la Fig 4 se muestran los resultados de la carbonilación de proteínas en cada uno de los grupos, existiendo significación estadística entre grupo control y HTA. Esta significación se repite en la diferenciación por sexo del grupo HTA. La representación de sexo en los pacientes con y sin síndrome metabólico no aparece en los resultados por falta de número de muestra para su correcta interpretación.

El menor número de muestra en estos parámetros se justifica por que se empezó a determinar en un periodo de tiempo posterior.

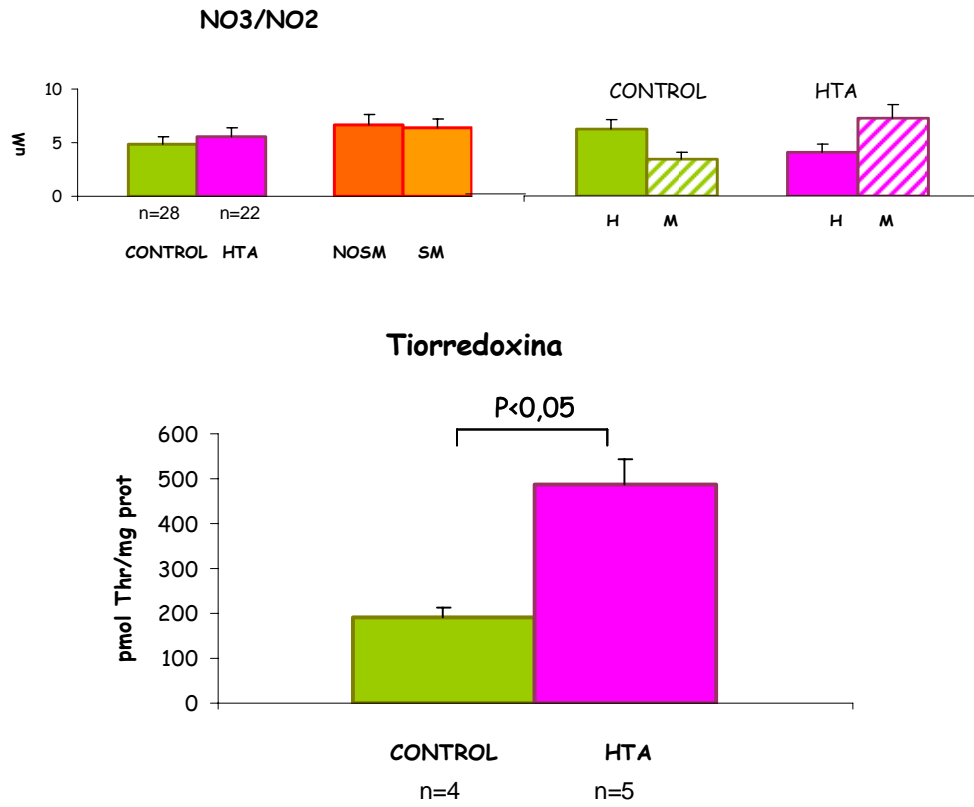
Fig 4: Representación gráfica de la carbonilación de proteínas.

Valores expresados como media \pm error estándar.

Por último, se presentan en la Fig 5, los resultados de metabolitos relacionados al estrés oxidativo, la producción de NO_3/NO_2 y la actividad tiorredoxina. La producción de nitratos no presenta diferencias significativas ni entre los grupos estudiados ni entre sexos.

De la actividad tiorredoxina sólo se presentan resultados entre grupo control y HTA, siendo éstos estadísticamente significativos entre sí. El número de muestra de esta cuantificación es muy inferior al resto de parámetros debido a que se empezó más tarde a determinar dicha actividad y a que se necesita partir de 7ml de sangre para la correcta realización del protocolo.

Fig 5: Valores de la producción de NO_3 y actividad tiorredoxina.



Valores expresados como media \pm error estándar.

1.2.1. VALORACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LA 8-oxo-dG EN ORINA Y CORRELACIÓN CON OTROS METABOLITOS DEL EO.

Se ha llevado a cabo la valoración de la excreción urinaria de 8-oxo-dG como marcador fiable de estrés oxidativo en la hipertensión (artículo sometido a publicación). Para ello se han sometido a análisis los valores de los parámetros de estrés oxidativo de 77 pacientes hipertensos en ausencia y después de tres meses de tratamiento antihipertensivo y 16 controles; los resultados se muestran en la tabla 2 junto con la significación estadística entre los grupos.

A pesar de que hasta ahora no haya hablado de los pacientes de hipertensión después de tratamiento antihipertensivo, creo que debo incluir en su totalidad el artículo que tenemos aprobado y a esperas de su publicación (Espinosa, 2007).

Tabla 2: Valoración de estrés oxidativo entre el grupo control y pacientes hipertensos sin tratamiento.

| | Controles | p | Sin tratamiento | p* | Despues tratamiento |
|------------------------------|-----------|--------|-----------------|--------|---------------------|
| Células mononucleares | | | | | |
| GSH (nmol/mg prot.) | 26.2±0.24 | <0.001 | 17.2±1.33 | <0.05 | 20.4±2.28 |
| GSSG (nmol/mg prot.) | 0.16±0.02 | <0.001 | 0.67±0.05 | <0.05 | 0.53±0.06 |
| GSSG/GSH x 100 | 0.60±0.07 | <0.001 | 5.80±0.64 | <0.001 | 1.70±0.10 |
| 8-oxo-dG nDNA | 3.97±0.65 | <0.001 | 5.94±0.24 | <0.05 | 5.40±0.26 |
| 8-oxo-dG mtDNA | 5.40±0.05 | <0.001 | 6.65±0.28 | <0.05 | 6.20±0.28 |
| Orina | | | | | |
| 8-oxo-dG | 1.97±0.05 | <0.001 | 3.42±0.10 | <0.001 | 2.86±0.09 |

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Los valores de 8-oxo-dG genómico y mitocondrial están expresados como el número de bases oxidadas/10⁶ deoxiguanosina y la urinaria en nmol 8-oxo-dG/mmoles creatinina.

La tabla 2 muestra como los pacientes de hipertensión arterial mejoran significativamente su nivel de estrés oxidativo con el tratamiento antihipertensivo, aumentando los valores de GSH y disminuyendo la concentración de bases modificadas oxidativamente, 8-oxo-dG, tanto del ADN nuclear como del mitocondrial. Esta reducción de los niveles de estrés oxidativo y metabolitos derivados en las células mononucleares se acompaña de una significativa reducción de la 8-oxodG urinaria.

La 8-oxo-dG urinaria se correlaciona significativamente con los niveles de estrés oxidativo, con el GSH, GSSG y su ratio GSSG/GSH, así como con la 8-oxo-dG nuclear y mitocondrial de las células mononucleares (Tabla 3). Los coeficientes de correlación entre la 8-oxo-dG urinaria y GSH, GSSG y el ratio GSSG/GSH son más elevados que los observados para esos parámetros con la 8-oxo-dG nuclear e iguales a los de la mitocondrial.

La relación entre la 8-oxo-dG urinaria y el ratio GSSG/GSH se muestran en la Fig 6.

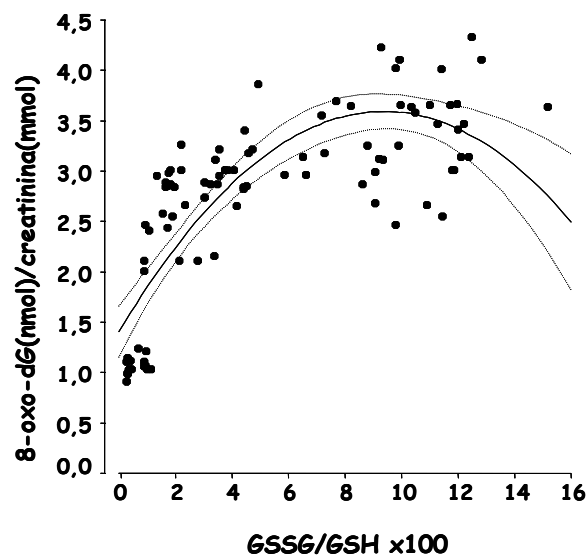
Tabla 3: Coeficientes de correlación de Pearson entre los niveles de 8-oxo-dG y los metabolitos del glutatión.

| | 8-oxo-dG Orina | 8-oxo-dG nuclear | 8-oxo-dG mitocondrial | GSH | GSSG | GSSG/GSH x100 |
|-----------------------|----------------|------------------|-----------------------|---------|---------|---------------|
| 8-oxo-dG orina | -- | 0.51** | 0.54** | -0.59** | 0.60** | 0.63** |
| 8-oxo-dG nuclear | | -- | 0.67** | -0.65** | 0.57** | 0.72** |
| 8-oxo-dG mitocondrial | | | -- | -0.63** | 0.62** | 0.60** |
| GSH | | | | -- | -0.75** | -0.83** |
| GSSG | | | | | -- | 0.98** |
| GSSG/GSH x100 | | | | | | -- |

Los valores son los coeficientes de correlación de Pearson.

** Valores que indican un coeficiente de correlación significativo <0,01.

Fig 6: Relación entre la 8-oxo-dG urinaria y el ratio GSSG/GSH%.



Por último, hemos analizado por múltiples análisis de regresión, la dependencia de la 8-oxo-dG urinaria de las fuentes mitocondrial y nuclear. La 8-oxo-dG urinaria está significativamente relacionada a la 8-oxo-dG mitocondrial ($p < 0,001$), pero no con la nuclear ($p = 0,886$), es decir, que la 8-oxo-dG urinaria representa un mayor grado de oxidación del DNAmT de los linfomonocitos sanguíneos.

Es por todo lo expuesto que se propone a la 8-oxo-dG urinaria como marcador del nivel de estrés oxidativo global en los pacientes de hipertensión arterial, y ante todo del estrés oxidativo que sufre la mitocondria.

1.2.2. CORRELACIÓN DE LA MICROALBUMINURIA CON LOS METABOLITOS DEL EO.

Mediante el análisis del coeficiente de correlación de Pearson hemos analizado las correlaciones entre la microalbuminuria y los metabolitos derivados y relacionados al estrés oxidativo; sólo se ha encontrado significación estadística entre la microalbuminuria y la SOD Mn. En la Tabla 4 se presentan los resultados de los coeficientes de correlación de Pearson y su nivel de significación estadística.

Tabla 4: Valores de Pearson entre la microalbuminuria y parámetros de EO.

| | Microalbuminuria (Correlación de Pearson) | Microalbuminuria Sig (bilateral) |
|--------------------------|---|--------------------------------------|
| MDA | -0,245 | 0,177 |
| GSH | -0,205 | 0,252 |
| GSSH | -0,191 | 0,286 |
| GSSG/GSH % | -0,078 | 0,665 |
| 8-oxo-dG urinaria | -0,019 | 0,946 |
| 8-oxo-dG nuclear | -0,120 | 0,507 |
| 8-oxo-dG mitocondrial | 0,001 | 0,995 |
| SOD Cu-Zn | 0,131 | 0,469 |
| SOD Mn | 0,504* | 0,047* |
| GPx | -0,174 | 0,334 |
| Catalasa | -0,322 | 0,068 |

1.2.3. ANÁLISIS POR RANGOS DE EDADES DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLITOS RELACIONADOS.

Al realizar un análisis comparativo de cada uno de los parámetros oxidativos estudiados hasta ahora, GSG, GSSG, GSSG/GSH%, MDA, 8-oxo-dG nuclear, mitocondrial y su excreción urinaria, comprobamos que solamente la diferencia de la 8-oxo-dG mitocondrial resulta estadísticamente significativa entre los tres rangos de edades en que hemos dividido a la población de estudio (< 35 años, entre 35-55 años y >55 años).

Los resultados obtenidos y el nivel de significación se muestran en la Tabla 5; comprobamos que es el grupo más joven el que presenta valores superiores de la base modificada oxidativamente en el ADN mitocondrial de los pacientes hipertensos.

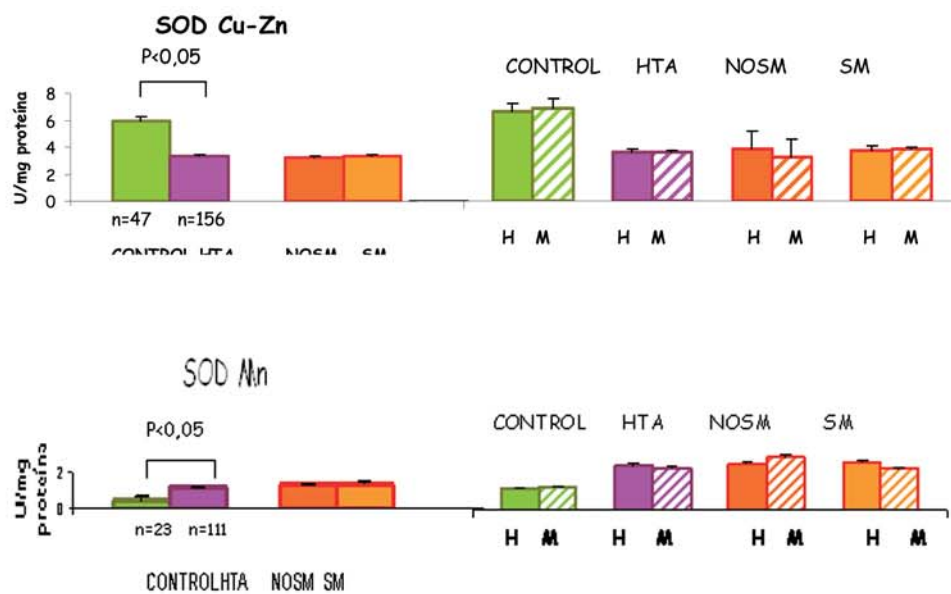
Tabla 5: Valores de la 8-oxo-dG mitocondrial por rango de edades.

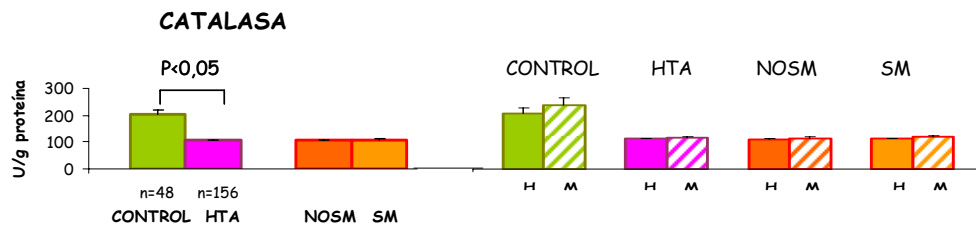
| | 8-oxo-dG mitoc. (8-oxo-dG/10 ⁶ dG) (Media ± Desv.Est) | p |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| <35 años n=21 | 7,15 ± 0,89 | p=0,033 <35 años- >55años |
| 35-55 años n=66 | 6,96 ± 0,97 | p=0,019 35-55años- >55 años |
| >55 años n=20 | 6,23 ± 1,38 | |

1.3) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS PRINCIPALES SISTEMAS ANTIOXIDANTES Y OXIDANTES.

Se muestran en las Fig 7 y 8 los resultados de la actividad de las principales enzimas encargadas de la defensa antioxidante del organismo, SOD Cu-Zn y Mn, Catalasa, GPx 1 y GSR, así como la diferenciación entre sexos de cada una de ellas. Todas presentan significación estadística entre los grupos control y HTA, pero esas diferencias no son apreciables entre ambos sexos. En el caso de la actividad GSR sólo se muestran diferenciados por sexos el grupo control y HTA debido al menor número de muestras de los pacientes diagnosticados con y sin síndrome metabólico.

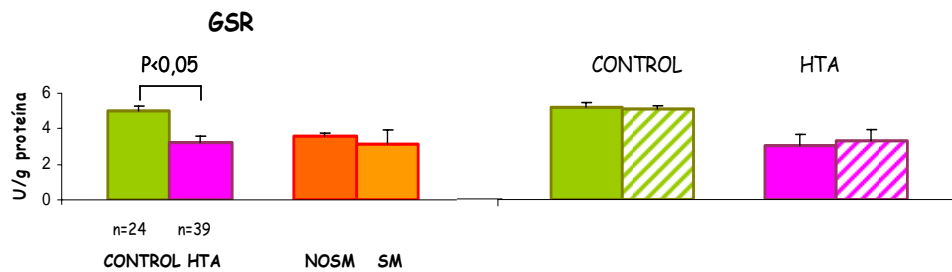
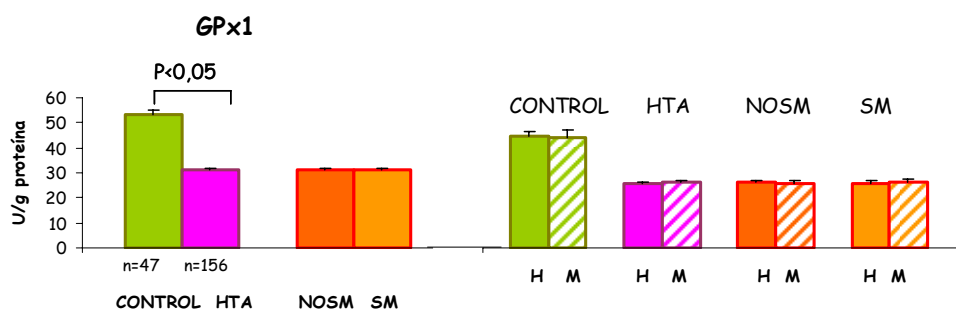
Fig 7: Actividades enzimáticas antioxidantes.





Valores expresados como media \pm error estándar.

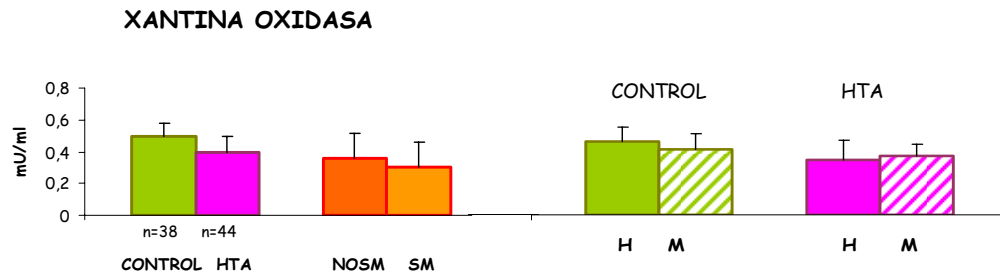
Fig 8: Actividades antioxidantes del sistema del glutatión.



Valores expresados como media \pm error estándar.

Como actividad prooxidante estudiada en las células mononucleares de los pacientes de este estudio, se muestran los resultados en la Fig 9 de la Xantina Oxidasa, no siendo estadísticamente significativos los grupos comparados, ni la diferenciación por sexos.

Fig 9: Actividad enzimática de la XO.

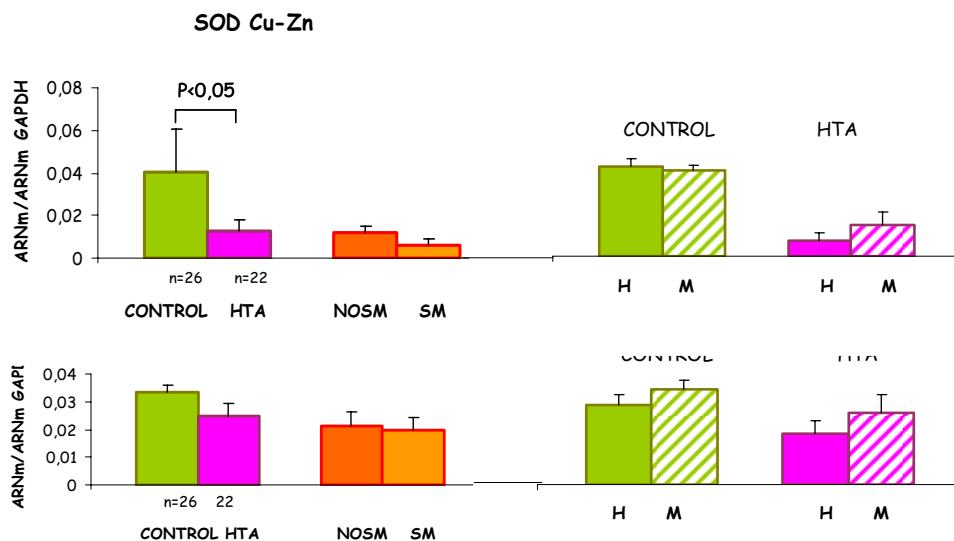


Valores expresados como media \pm error estándar.

1.4) CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE LOS GENES SELECCIONADOS.

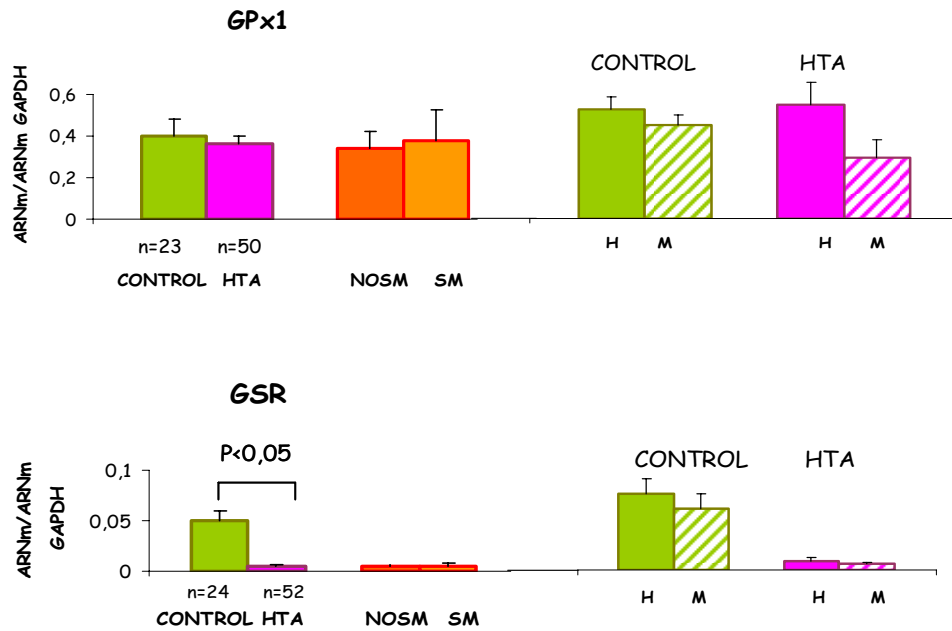
En las Fig 10 y 11 se presentan los resultados de la cuantificación por RT-PCR cuantitativo a tiempo real de los ARNm de los genes encargados de la defensa primaria antioxidante, SOD Cu-Zn, Catalasa, GSR y GPx1, así como sus niveles de significación estadística. Dichos resultados se muestran también diferenciados por sexos, aunque en ninguna de las cuantificaciones sale significativa la diferencia entre los dos sexos. Parte de este trabajo ha sido realizado por M^oLuisa Mansego y pertenecen a la parte experimental de su tesis doctoral.

Fig 10: Cuantificación de ARNm de las actividades enzimáticas antioxidantes.



Valores expresados como media ± error estándar.

Fig 11: Cuantificación de ARNm de las enzimas del sistema del glutatión.



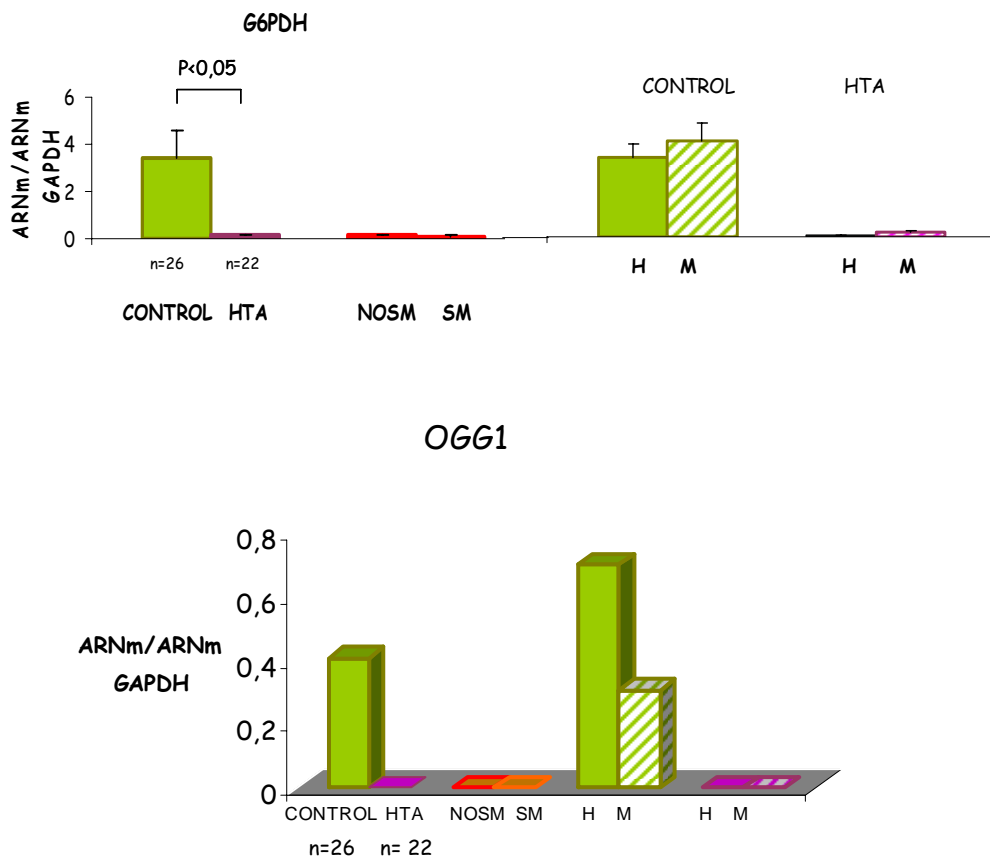
Valores expresados como media \pm error estándar.

En la Fig 12 se muestra la cuantificación de los genes de la G6PDH, enzima que retroalimenta de NADPH al sistema del glutatión, y la OGG1, glicosilasa encargada de la eliminación de la 8-oxo-dG, cuya representación gráfica en 3 dimensiones ha sido seleccionada para una mejor visualización de las diferencias entre grupos debido a los 3 órdenes de magnitud de diferencia entre ellos, si bien, no hay significación estadística. La cuantificación de la expresión de estas dos enzimas muestra que el grupo HTA está desprotegido frente al ataque oxidativo al ADN, teniendo casi inhibida la expresión de la OGG1 y

demostrando que los HTA presentan alterados los mecanismos de reparación del ADN.

De igual modo, la expresión de la G6PDH es muy inferior a la cuantificada en el grupo control, por lo que en HTA también existen carencias de aporte de NAPDH por esta actividad enzimática, alterando así a los sistemas dependientes de este poder reductor, como el sistema del glutatión.

Fig 12: Cuantificación de ARNm de la expresión de G6PDH y OGG1.



Valores expresados como media ± error estándar.

2) ESTUDIO COMPARATIVO DEL GRADO DE ESTRÉS OXIDATIVO ENTRE EL GRUPO CONTROL Y LOS 3 GRUPOS PATOLÓGICOS DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR.

2.1) CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.

En la tabla 6 se detallan las características generales de los grupos de estudio: HFC y HF. Estos valores se han comparado con los obtenidos en el grupo control y sujetos hipertensos.

Es importante resaltar sobre los datos que nos ofrece la Tabla 2, que el número de pacientes y controles masculinos supera al de las mujeres en todos los casos excepto en el grupo HF que hay tres veces más de pacientes femeninas; los valores de la media de edad en cada uno de los grupos patológicos son muy similares, al igual que ocurre con el índice de masa corporal (kg/m^2) y no existen diferencias significativas entre los grupos.

Respecto a los valores de glucosa basal (mg/dl), colesterol total (mg/dl), colesterol HDL (mg/dl) y triglicéridos (mg/dl) se observa en la tabla 2 como existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; dichas diferencias pueden observarse en los grupos de dislipemias frente al grupo control y al grupo HTA.

Tabla 6: Características generales de la población de estudio.

| | CONTROLES n= 54 | HTA n= 165 | HFC n=47 | HF n=32 | p |
|--|---------------------------|----------------------|--------------------|-------------------|---|
| Edad | 46,2 ± 10,3 | 43,1±11,0 | 45,7 ± 8,96 | 41,2 ± 12,6 | NS |
| Sexo (H/M) | 34 / 20 | 88/67 | 28 / 19 | 8 / 24 | NS |
| Índice de masa corporal (kg/m ²) | 27,1 ± 3,1 | 29,5 ± 3,1 | 26,79± 4,01 | 26,33 ± 3,91 | NS |
| Glucosa basal (mg/dL) | 100,3 ± 9,8 | 103,9 ± 10,6 | 106,91 ± 17,7 | 88,0 ± 8,28 | p<<0,05 CONTROL-HF HTA-HF HFC-HF |
| Colesterol total (mg/dL) | 206,3 ± 33,1 | 210,0 ± 29,8 | 268,6 ± 85,44 | 307,7 ± 76,68 | p<0,05 CONTROL-HFC CONTROL-HF HTA-HFC HTA-HF |
| Colesterol HDL (mg/dL) | 47,5 ± 9,9 | 45,6 ± 9,4 | 40,97 ± 9,7 | 56,22 ± 13,91 | p<<0,05 CONTROL-HFC CONTROL-HF HTA-HFC HTA-HF |
| Triglicéridos (mg/dL) | 121,0 ± 43,2 | 138,7 ± 68,2 | 370,9 ± 77,3 | 118,2 ± 51,07 | p<<0,05 CONTROL-HFC HTA-HFC |

- Valores expresados como media ± desviación estándar.

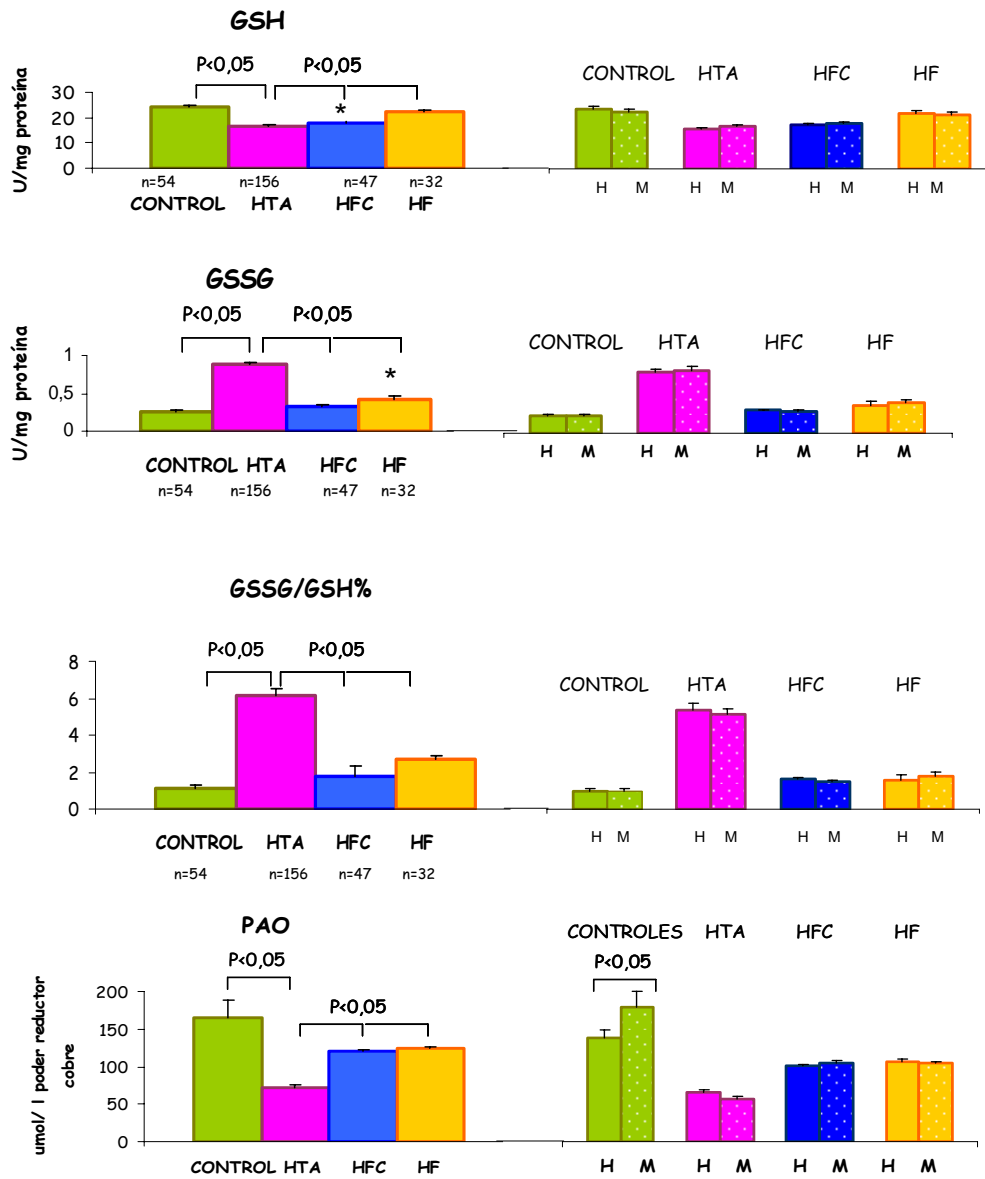
2.2) ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN, MARCADORES DE EO Y METABOLITOS RELACIONADOS.

La presentación de los resultados será también mediante gráficos de columnas; la significación estadística entre los grupos se especifica sobre dichos gráficos; el asterisco () muestra dicha significación entre el grupo control y los grupos de dislipemias. Se compara además la HTA con el grupo control y los otros grupos patológicos. Los resultados se presentan también diferenciados por sexos en las diferentes patologías.*

Para el análisis del índice celular de estrés oxidativo de las células mononucleares, se analizaron los resultados del glutatión (GSH, GSSG, GSSG/GSH%) y del PAO plasmático en la Fig 13. Los niveles de los metabolitos del glutatión muestra significación estadística entre los tres grupos sometidos a estudio, sin embargo, la HTA presenta valores de GSSG de hasta 3 veces más que el resto de grupos; el PAO también demuestra que es la HTA la patología más afectada oxidativamente hablando.

Respecto a la diferenciación entre sexos, sólo se han encontrado diferencias significativas en la cuantificación del PAO del grupo control, siendo las mujeres las que presentan mayor poder antioxidante en plasma.

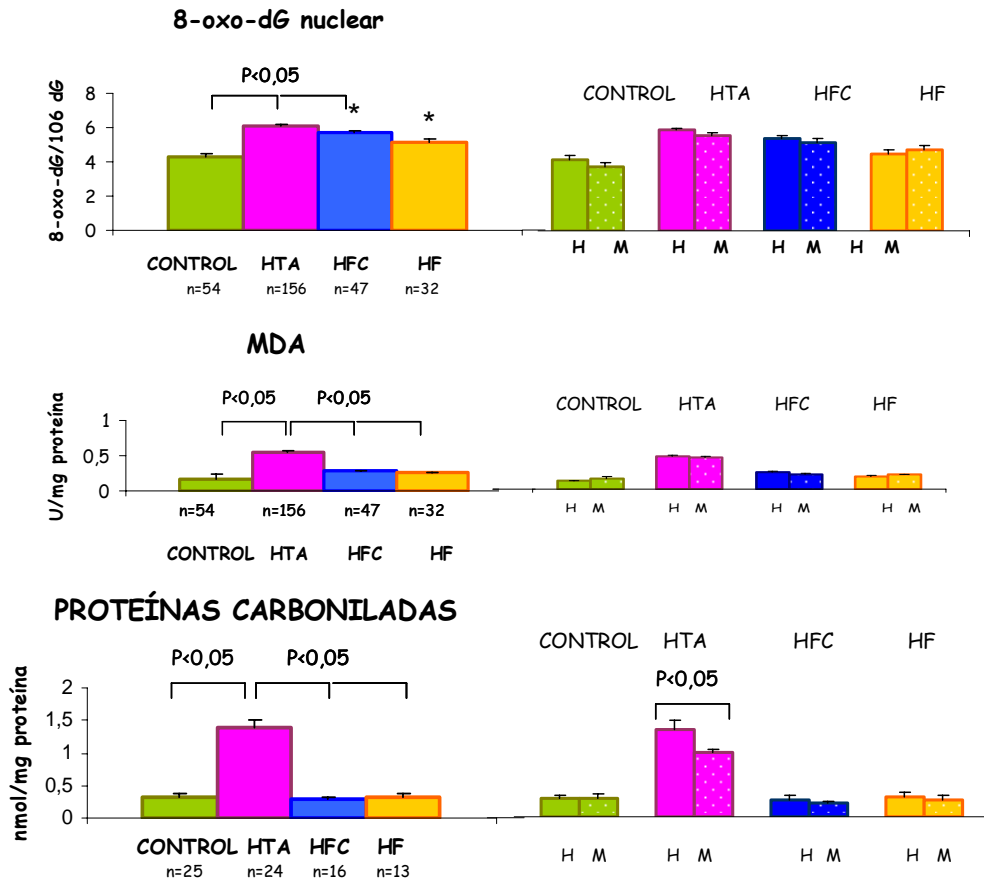
Fig 13: Niveles del estado redox celular y del PAO plasmático.



- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
- * $p < 0,05$ con el grupo control.

Se muestran a continuación en la Fig 14, los resultados de los productos de oxidación derivados de la modificación oxidativa al ADN (8-oxo-dG), de la peroxidación lipídica (MDA) y la carbonilación de proteínas. Tanto los valores de MDA como la carbonilación de proteínas se presentan elevados en HTA muy por encima del resto de grupos analizados; sin embargo, los valores de 8-oxo-dG encontrados en las tres patologías de alto riesgo cardiovascular son superiores a los del grupo control, y aunque la HTA es el grupo más oxidado, las dislipemias poseen valores de 8-oxo-dG cercanos a la HTA. De los resultados obtenidos respecto a la diferenciación de los parámetros según el sexo, sólo presenta significación estadística la carbonilación de proteínas en HTA.

Fig 14: Productos de la modificación oxidativa al ADN, lípidos y proteínas.

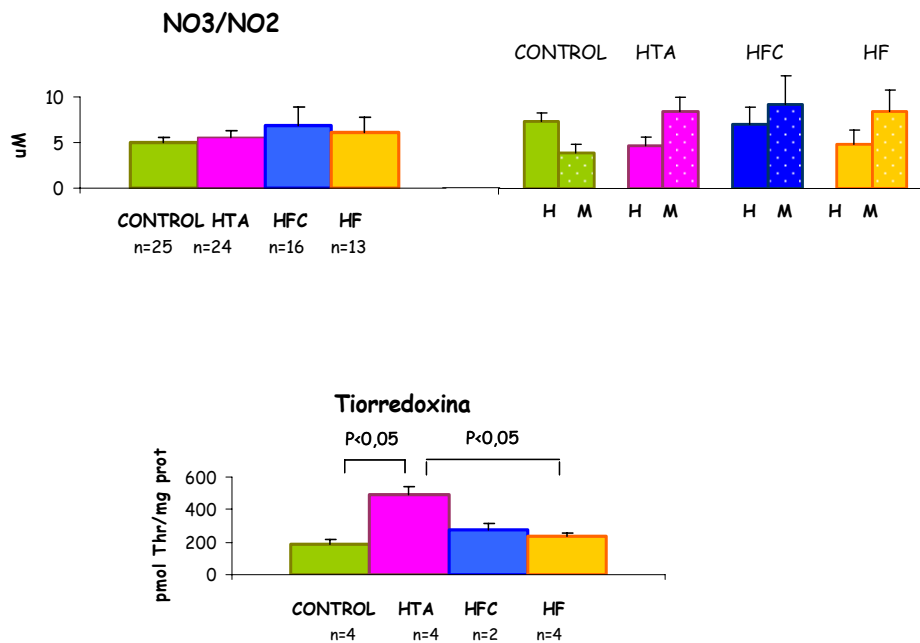


- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
 * $p < 0,05$ con el grupo control.

En la Fig 15 se muestran los resultados de los metabolitos relacionados a la presencia de estrés oxidativo, la producción de NO_3 y la actividad tiorredoxina en los cuatro grupos estudiados. La producción de NO_3 no presenta diferencias ni entre los grupos ni entre sexos, sin embargo, la

actividad tiorredoxina está significativamente aumentada en la HTA respecto de los otros grupos. La actividad Tiorredoxina no se ha diferenciado según el sexo por el bajo número de muestras.

Fig 15: Niveles de producción de NO_3 y actividad tiorredoxina.



- Valores expresados como media \pm desviación estándar.

* $p < 0,05$ con el grupo control.

2.2.1) CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL TOTAL Y DE GLUCOSA BASAL CON LOS METABOLITOS DE EO EN LAS DISLIPEMIAS.

Al realizar el análisis estadístico de las variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson hemos correlacionado en los pacientes dislipémicos los niveles de colesterol total y de glucosa basal con los metabolitos derivados y relacionados al estrés oxidativo. Los pacientes de HF sólo presentan correlación significativa entre la glucosa basal y la actividad catalasa; en los HFC las correlaciones significativas se dan entre el colesterol total y el GSSG, la GSSG/GSH%, la 8-oxo-dG nuclear y la SOD Cu-Zn. En la Tabla 7 se presentan los valores de cada una de estas correlaciones con su niveles de significación estadística.

Tabla 7: Valores significativos del coeficiente de correlación de Pearson entre la glucosa basal y el colesterol total en los pacientes dislipémicos.

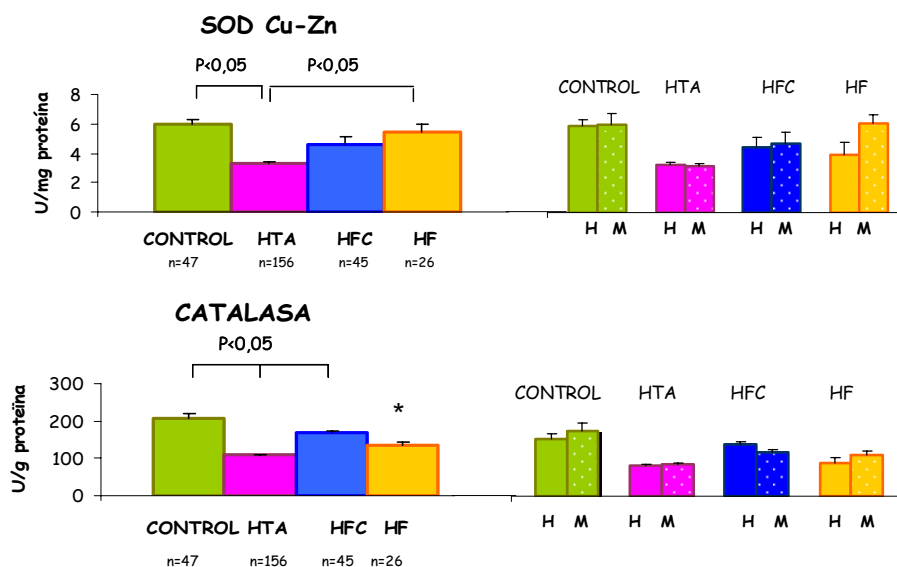
| HF | Glucosa basal (mg/dL) | HFC | Colesterol total (mg/dL) |
|----------------------------|--------------------------|---|-----------------------------|
| Catalasa (U/g proteína) | P= 0,439 p= 0,047* | GSSG (U/mg proteína) | P= -0,321 p= 0,032* |
| | | GSSG/GSH% | P= -0,377 p=0,011* |
| | | 8-oxo-dG nuclear (8-oxo-dG/10 ⁶ dG) | P=-0,329 p= 0,028* |
| | | SOD Cu-Zn (U/mg proteína) | P= -0,302 p=0,049* |

2.3) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS PRINCIPALES SISTEMAS ANTIOXIDANTES Y OXIDANTES.

Para el estudio de la actividad de los principales sistemas antioxidantes, se muestran a continuación los resultados de SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1 y GSR en los 4 grupos sometidos a estudio, así como la significación estadística entre cada uno de ellos (Fig 16 y 17). De todas las patologías es la HTA la que presenta valores más bajos de actividad en las cuatro actividades analizadas. De la comparación entre sexos de los resultados, sólo la GPx1 en HF presenta significación estadística.

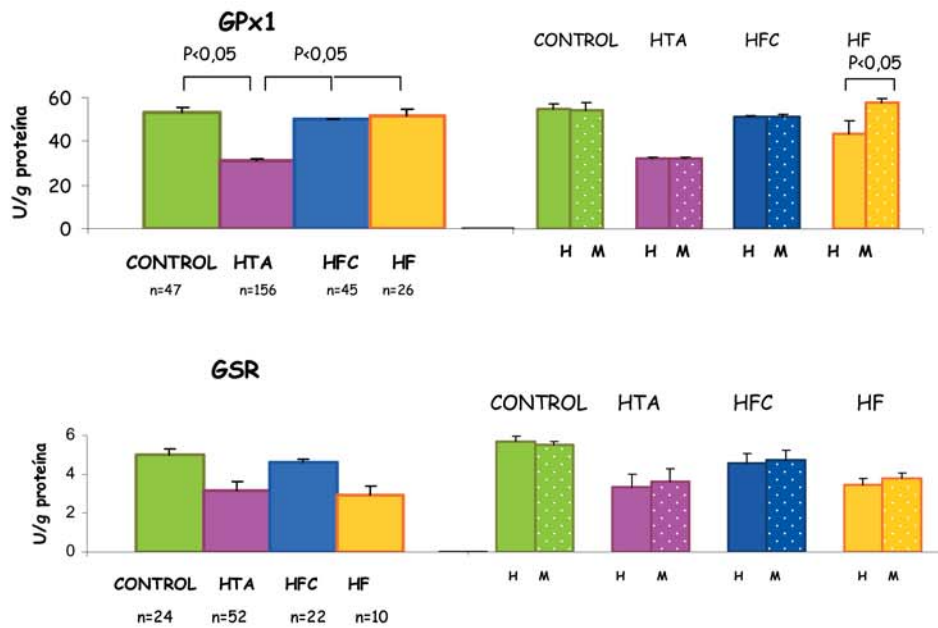
Como sistema prooxidante, se presentan los datos de la xantina oxidasa de los cuatro grupos, si bien, no hay diferencias significativas ni entre ellos, ni entre sexos (Fig 17).

Fig 16: Actividades enzimáticas SOD Cu-Zn y Catalasa.



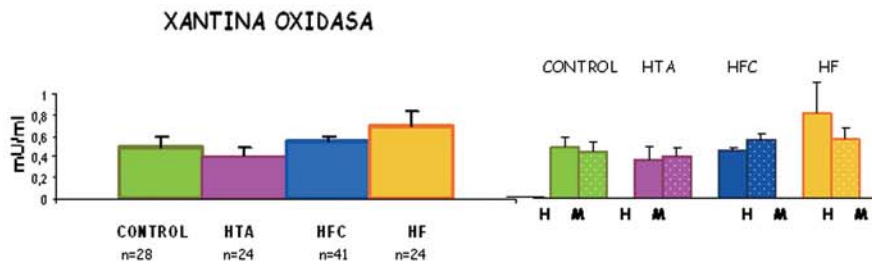
- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
* $p < 0,05$ con el grupo control.

Fig 17: Actividades enzimáticas del sistema del glutatión.



- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
* $p < 0,05$ con el grupo control.

Fig 18: Actividad enzimática de la Xantina Oxidasa.

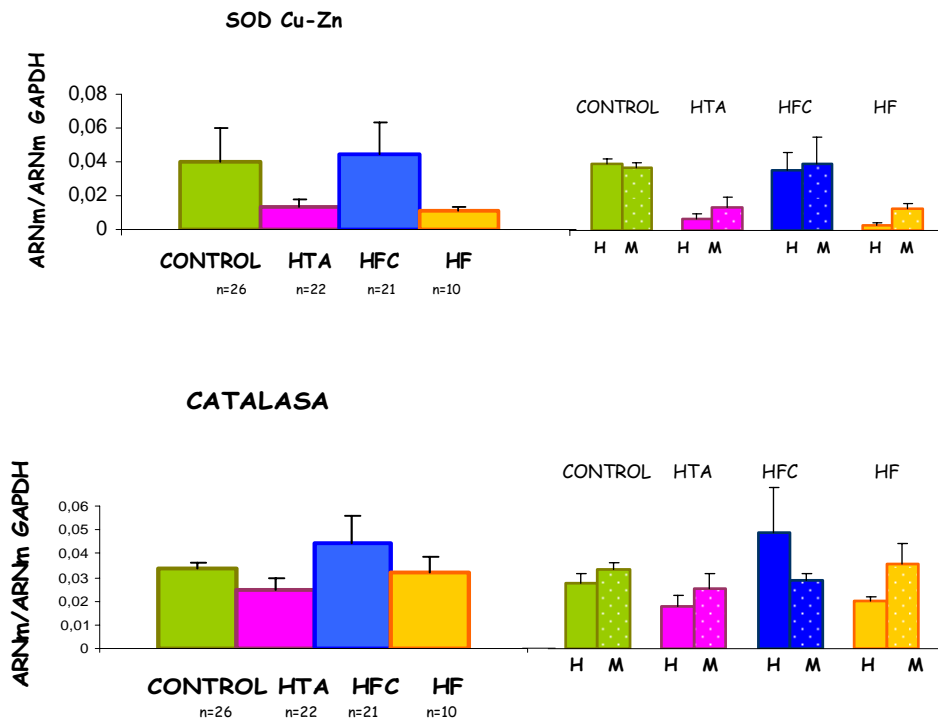


- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
* $p < 0,05$ con el grupo control.

2.4) CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE LOS GENES SELECCIONADOS.

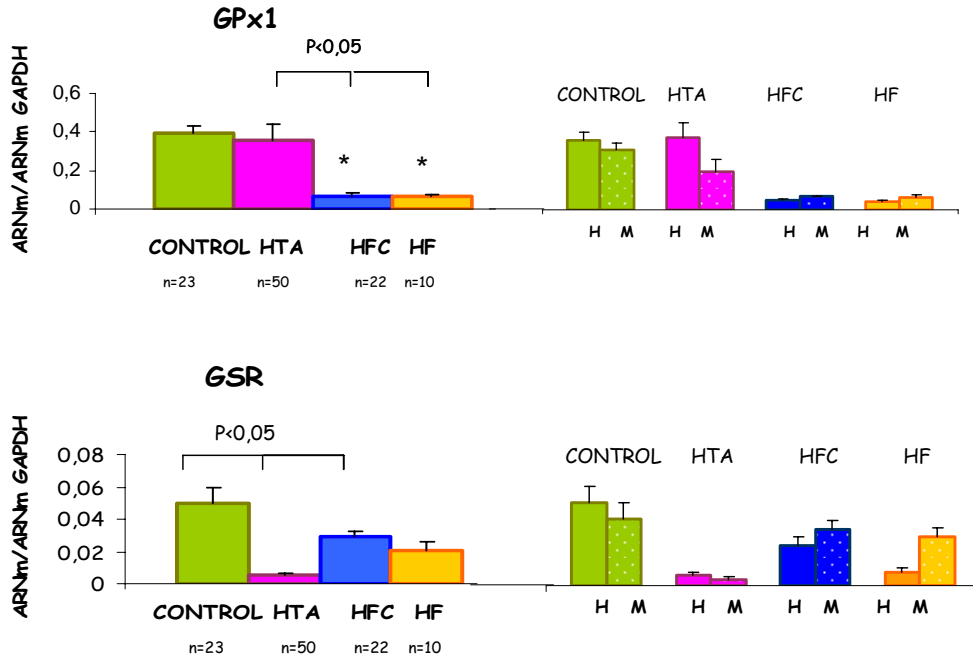
Se presentan los resultados de la cuantificación por RT-PCR cuantitativo a tiempo real de los genes encargados de la defensa primaria antioxidante, SOD Cu-Zn, Catalasa, GSR y GPx1, así como sus niveles de significación estadística (Fig 19 y 20). En la Fig 19 se observa que ni la SOD Cu-Zn ni la actividad catalasa presentan diferencias con significación estadística entre los grupos estudiados. En la Fig 20 la cuantificación de las enzimas del glutati6n muestra que la GPx1 no presenta significaci6n estadística entre el grupo control y HTA pero sí entre las dos patologías de dislipemias y los otros grupos. Por otra parte, la cuantificaci6n de la GSR revela una disminuci6n en la expresi6n de los 3 grupos patol6gicos respecto al grupo control, si bien, dicha disminuci6n es mucho m1s acusada en la HTA. La diferenciaci6n por sexos no presenta significaci6n estadística en ninguna de las cuantificaciones.

Fig 19: Cuantificación de ARNm de las actividades SOD Cu-Zn y Catalasa.



- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
 * $p < 0,05$ con el grupo control.

Fig 20: Cuantificación de ARNm de las actividades del sistema glutatión.

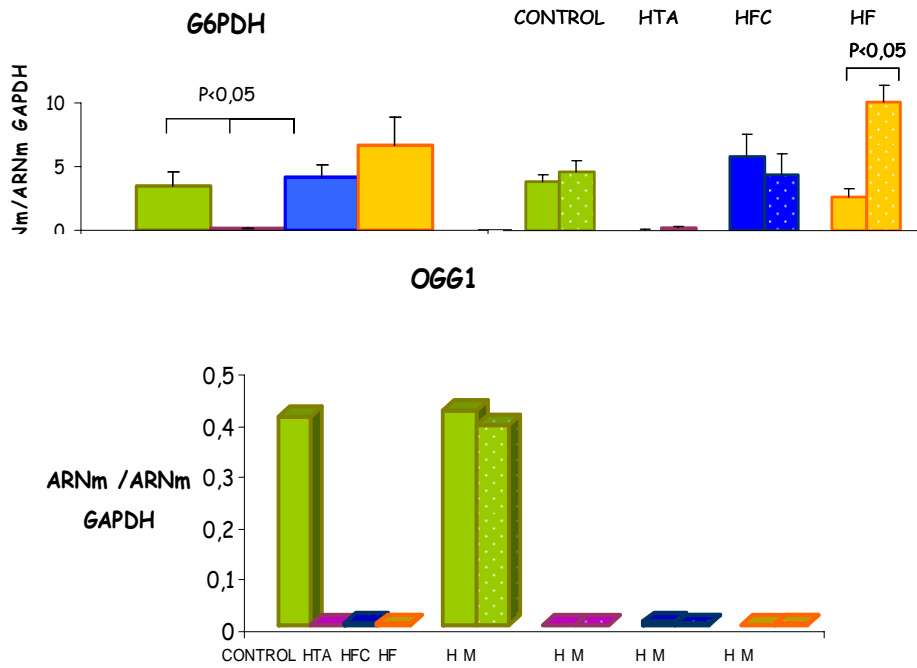


- Valores expresados como media \pm desviación estándar.
 *p <0,05 con el grupo control.

Finalmente se muestra la cuantificación de los genes de la G6PDH y la OGG1; su representación gráfica en tres dimensiones ha sido seleccionada para una mejor visualización de las diferencias entre grupos debido a los tres órdenes de magnitud de diferencia entre ellos, En la Fig 21, la cuantificación revela que los tres grupos patológicos analizados están desprotegidos frente al ataque oxidativo al ADN presentando valores de expresión de la glicosilasa OGG1 muy inferiores a los del grupo control. Por su parte la G6PDH está prácticamente

inhibida en la HTA, mientras que los grupos de dislipemias presentan valores superiores al grupo control, aunque no muestran diferencias con significación estadística entre ellos. El grupo HF presenta significación entre sexos en la G6PDH.

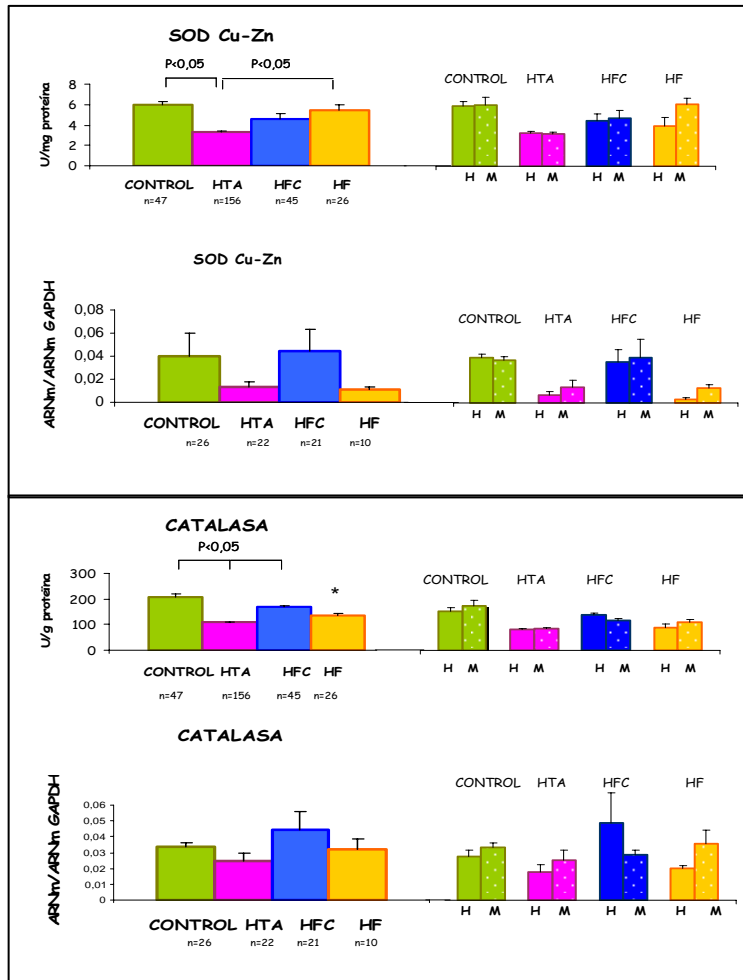
Fig 21: Cuantificación de la expresión de los genes de la G6PDH y OGG1.



3) SÍNTESIS COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

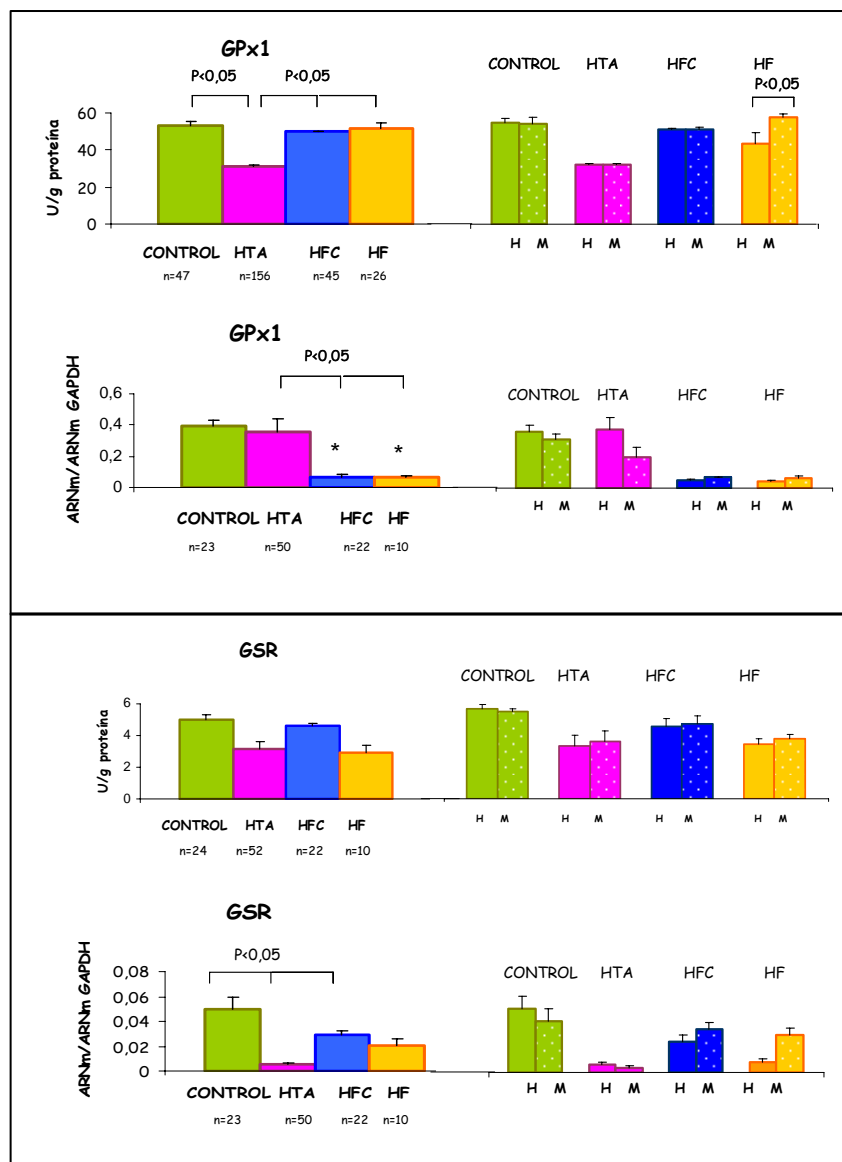
En esta parte final de los resultados y para integrar toda la información obtenida, se presentan los gráficos enfrentados de actividad y expresión de las proteínas analizadas en cada patología cardiovascular.

Fig 22: Actividad y expresión de SOD Cu-Zn y Catalasa en los tres grupos de alto riesgo cardiovascular analizados y el grupo control.



- Valores expresados como media ± desviación estándar.
 * p < 0,05 con el grupo control.

Fig 23: Actividad y expresión de las enzimas del sistema glutatión en los tres grupos de alto riesgo cardiovascular analizados y el grupo control.



- Valores expresados como media \pm desviación estándar.

*p < 0,05 con el grupo control.

En la Fig 22 podemos observar como es la HTA la patología cardiovascular que presenta valores más críticos tanto en la actividad como en la expresión de la SOD Cu-Zn y Catalasa a pesar de que es el grupo con mayor grado de estrés oxidativo, si bien, la cuantificación no presenta significación estadística entre los grupos.

Esto indica que el hipertenso no tratado previamente no responde correctamente al aumento de EO producido en su organismo, presentando una desregulación en la expresión de los sistemas antioxidantes en las células mononucleares circulantes.

La Fig 23 confirma la desregulación de la respuesta al EO en la HTA ya que presentando menor actividad en las actividades enzimáticas del sistema del glutatión, la expresión de las mismas resulta insuficiente para el control de la homeostasis oxidativa, si bien, el nivel cuantificado para los dos genes presenta un patrón diferente frente al grupo control.

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se han analizado los niveles de EO en los pacientes de las patologías de alto riesgo cardiovascular seleccionadas (HTA, HFC y HF) observándose un aumento del EO en cada una de ellas, la disminución de actividades enzimáticas antioxidantes, así como un desacoplamiento en los niveles de estrés oxidativo, presentando mayores niveles de metabolitos oxidados en su sistema vascular que el grupo control; si bien, es el grupo HTA el que presenta valores más extremos en todos los parámetros analizados quedando así patente que esta patología es la que presenta un mayor desequilibrio oxidativo.

Este trastorno del metabolismo oxidativo en la sangre y las células mononucleares de la circulación periférica de los grupos analizados, probablemente afecte a las funciones de las células endoteliales y contribuya al desarrollo y mantenimiento de complicaciones cardiovasculares. Además, los ROS parecen ser un importante mecanismo de señalización celular, responsable de algunas de las características de la formación de la lesión vascular (Kodja 1999).

A pesar de que HTA es el grupo más afectado oxidativamente hablando, este exceso no se relaciona con la presencia de síndrome metabólico en los pacientes diagnosticados. De la misma manera, no existen diferencias en casi ningún marcador entre SM y NO SM.

Son numerosos los métodos utilizados para medir el estrés oxidativo en los sistemas biológicos. Usualmente se utilizan los marcadores bioquímicos de

estrés oxidativo como son: GSH, GSSG, MDA, 8-oxo-dG nuclear, mitocondrial y la excreción urinaria de este metabolito, para estudiar el estado redox de las células y del plasma. Estas determinaciones las hemos realizado mediante detección por HPLC, cuyos protocolos fueron puestos a punto y validados en nuestro laboratorio (Sáez 2005).

Así mismo, los protocolos comerciales de determinación de actividades enzimáticas, cuantificación proteica y de metabolitos oxidativos, tanto por técnicas colorí-, fluorí- espectrofotométricas y ELISAS han sido puestos a punto y nos aseguran una alta fiabilidad en las medidas y en la evaluación de la magnitud del estrés oxidativo.

Los resultados de cuantificación por PCR cuantitativo a tiempo real están optimizados en el Laboratorio de Estudios Genéticos donde se han realizado. La cantidad de oligonucleótido se optimizó para obtener amplificaciones parecidas y curvas de fusión de alta pureza. Las muestras son amplificadas por duplicado y todos los datos fueron verificados para su correcta amplificación usando la primera derivada de las curvas de fusión. Para calcular el número absoluto de copias, las curvas estándar para cada gen fueron representadas con muestras cuantificadas de ADNc durante cada reacción de PCR a tiempo real (Shih 2003) y normalizados con los niveles de ARNm de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ;.

Los resultados obtenidos sugieren que el estrés oxidativo representa un mecanismo común y subyacente en la patogenicidad de los tres grupos de

patologías estudiadas, y posiblemente contribuya al desarrollo de complicaciones cardiovasculares. A continuación se analizarán por separado los resultados de este estudio, empezando por la hipertensión arterial esencial (HTA), su estudio comparativo respecto del grupo control y su asociación o no con el diagnóstico de síndrome metabólico en los pacientes hipertensos.

Éste y otros estudios (Redon 2003; Sáez 2004) demuestran que los enfermos de hipertensión que no han recibido ningún tipo de tratamiento poseen una importante reducción en los mecanismos antioxidantes, presentando niveles significativamente reducidos de GSH y elevados de GSSG respecto al grupo control. De la misma manera, la base mutagénica derivada de la modificación oxidativa del ADN (8-oxo-dG nuclear, mitocondrial y su tasa de eliminación urinaria) está significativamente incrementada en dichos pacientes en comparación al grupo control, así como los valores de MDA, proteínas carboniladas y actividad tiorredoxina; la capacidad antioxidante total de este grupo también se encuentra significativamente mermada respecto del grupo control. En relación a la producción total de nitratos no se han encontrado diferencias entre ambos grupos.

Las diferencias observadas se refieren en todo momento a los grupos control y HTA ya que el análisis de los parámetros realizado, dependiendo de que los pacientes hipertensos tengan asociado o no síndrome

metabólico, nos revela que no existen diferencias entre ambos grupos. Esto nos confirma que es la hipertensión la patología asociada al estrés oxidativo, siendo indiferentes los otros factores que determinan el diagnóstico de síndrome metabólico.

Hay que hacer aquí tres puntualizaciones sobre la determinación de algunos de los resultados de los parámetros citados. Respecto a la determinación de la actividad tiorredoxina comentar que el número de pacientes sobre los que se ha determinado dicha actividad es mucho menor que el resto de parámetros ya que para la correcta realización del protocolo y debido al límite de detección del método, debemos partir del orden de 100-120 millones de células/ml, en la mayoría de los casos de 7ml de sangre de cada paciente, y la limitación en la disponibilidad de muestra ha sido la responsable de que dicha determinación se haya realizado en menor número de muestras. Además, la determinación de la actividad Trx se ha llevado a cabo estando muy avanzada esta investigación, debido a que la cuantificación del ARNm de la Tiorredoxina 1 (Trx1) (resultados pertenecientes a la tesis doctoral de M^a Luisa Mansego) mostraba una activación en HTA respecto del grupo control y se decidió poner a punto la técnica por nuestro grupo investigador.

Es importante también comentar la producción total de nitratos presente en los grupos analizados. La capacidad para aumentar la disponibilidad de NO, sería determinante para la protección frente al deterioro orgánico inducido por la elevación crónica de la hipertensión arterial, si bien, el grupo HTA no presenta diferencias respecto del grupo control. La

disponibilidad de NO depende tanto de su síntesis como de su inactivación por los radicales superóxido, los cuales a su vez resultan del equilibrio entre su producción y su eliminación por los sistemas antioxidantes.

La determinación de la actividad Xantina Oxidasa nos muestra una elevada variabilidad en los grupos estudiados, sin que se encuentren diferencias significativas entre ellos. De igual modo, la diferenciación entre sexos de la actividad Xantina Oxidasa no muestra diferencias entre ambos, lo cuál coincide con lo publicado anteriormente por (Rasmussen 1996).

Responsable de todo este desajuste oxidativo es la importante reducción que sufren los mecanismos antioxidantes; en los hipertensos sin tratamiento los niveles de enzimas antioxidantes citoplasmáticas SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1 y GSR están significativamente disminuidas respecto al grupo control, mientras que la SOD Mn posee aumentado su nivel de actividad.

OXIDACIÓN DE BIOMOLÉCULAS: como hemos visto, esta reducción de la eficacia antioxidante en las células mononucleares de los hipertensos, se asocia a daño a fosfolípidos, ADN y otras moléculas, como demuestra la positiva y significativa correlación observada entre MDA y 8-oxo-dG nuclear y mitocondrial, que indica el simultáneo impacto de los ROS en

diferentes sistemas biológicos, validando así los métodos usados en este estudio (Redon 2003).

El análisis por rango de edades de los los parámetros relacionados y derivados con el estrés oxidativo, nos revela que tan sólo la 8-oxo-dG mitocondrial presenta diferencias estadísticamente significativas entre los tres rangos de edades en que hemos dividido la población. El hecho de que sea el grupo más joven el que tenga un mayor número de bases oxidadas en el ADN mitocondrial se explica ya que existe una mayor actividad metabólica mitocondrial; esto se relaciona con la teoría del envejecimiento de Jaime Miquel (Miquel 1980) en la que explica que el envejecimiento se debe a la disminución de las funciones metabólicas mitocondriales. Sin embargo, el joven que presente HTA tendrá peor fondo genético que una persona de mayor que desarrolle la enfermedad.

El incremento observado en la oxidación del ADN en las células mononucleares de los hipertensos sin tratamiento, implica e involucra al altamente reactivo radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estos radicales reaccionan con la guanosina para formar (8-oxo-dG), si bien, la contribución de otros oxidantes al daño al ADN como los iones hipoclorito o peroxinitrito deben ser también considerados. En un entorno en el que la producción o biodisponibilidad de H_2O_2 está intensificada, como en el caso de la baja actividad catalasa, la reacción con los iones cloruro quizás determine la formación de hipoclorito y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) como en la reacción de la mieloperoxidasa (Reacción 12, pag 29). Por otra parte, el peroxinitrito

derivado de la combinación de O_2 con óxido nítrico es suficientemente reactivo para inducir daño en el ADN; dicho daño influencia la expresión de varios genes de respuesta al estrés que participan en la regulación del ciclo celular y la proliferación celular (Pryor 1995). De este modo, el progresivo incremento de la oxidación del ADN puede inducir un aceleramiento del fenotipo envejecido en las células del endotelio vascular de estos pacientes.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en relación con la acumulación de bases modificadas oxidativamente en el ADN es si esta ocurre por saturación de los mecanismos de reparación del ADN o bien si son debidas a un fallo en su actuación. La respuesta a esta cuestión nos la da la cuantificación de la expresión de la glicosilasa OGG1, que como podemos ver se encuentra prácticamente inhibida en la HTA respecto a la expresión que presenta el grupo control.

El análisis de la secuencia del ADNc de la glicosilasa OGG1 en humanos revela dos clases de ARNm codificados por α -hOGG1 y β -hOGG1 respectivamente (Boiteux 2000). Por experimentos inmunocitoquímicos, se ha comprobado que la forma α se localiza en el núcleo celular, mientras que la β es mitocondrial (Takao 1998). El ensamblaje de la región C-terminal de este gen codifica dos tipos principales de variantes, tipo 1 y tipo 2, dependiendo del último exón de la secuencia. La variante alternativa tipo 1 termina con el exón 7 y la tipo 2 con el exón 8. Todas las variantes comparten en común la región N-terminal, la cuál posee una

diana de señalización mitocondrial, esencial para la localización mitocondrial.

La expresión de la OGG1 no está regulada durante el ciclo celular (Bouziane 2000; Dhenaut 2000), y bajo severas condiciones de estrés oxidativo, ningún ARNm ni proteína OGG1 son inducidos (Saitoh 2001). La hOGG1 es dinámicamente regulada en su localización nuclear como una DNasa sensible a la cromatina; cuando la matriz nuclear aparece es el sitio preferente de asociación de la cromatina durante la interfase, mientras que la relocalización de la proteína OGG1 condensa la cromatina durante la mitosis (Dantzer 2002). Estos resultados sugieren que la OGG1 quizás este involucrada en algunos aspectos del metabolismo y reparación del ADN, y su papel funcional es principalmente llevado a cabo durante las etapas pre-replicas del ciclo celular.

Diversos estudios han determinado que la expresión de la OGG1 se encuentra prácticamente inhibida en numerosas patologías, todas relacionadas con aumento de estrés oxidativo: Alzheimer (Iida. T Furuta 2002), cáncer de esófago (Hagiwara 2005), envejecimiento (Chen 2003), lo que sugiere que ese desorden oxidativo ejerce su acción inhibiendo el promotor de dicho gen.

Como los resultados nos indican que la OGG1 en la HTA tiene inhibida su expresión, estos pacientes estarán desprotegidos frente a la acumulación de daño oxidativo al ADN presente en las células circulantes de los hipertensos sin tratamiento.

Hay que comentar en este punto el hecho de que la tasa de excreción urinaria de 8-oxo-dG aumenta en el grupo HTA en comparación con el grupo control aún teniendo casi inhibida la expresión de la OGG1. Hay que tener en cuenta que existen otros mecanismos de reparación del daño oxidativo al ADN que implica a otras proteínas que no han sido estudiadas y justificarían la elevación de la tasa urinaria de 8-oxo-dG en los pacientes de hipertensión.

Si nos referimos a la 8-oxo-dG urinaria como marcador para monitorizar los cambios de estrés oxidativo en la hipertensión hay que comentar que dicho parámetro se correlaciona positivamente tanto con los metabolitos del GSH como con las bases oxidadas del ADN nuclear y mitocondrial en las células sanguíneas circulantes de los pacientes hipertensos. La facilidad para la obtención de muestra nos permite realizar diferentes medidas, dando la oportunidad de monitorizar los cambios de estrés oxidativo por la medida de la 8-oxo-dG en las muestras de orina de pacientes hipertensos.

La 8-oxo-dG nos podrá servir como indicador del riesgo cardiovascular y del nivel de EO presente en el sistema cardiovascular de cada individuo.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS: para el mantenimiento de la homeostasis oxidativa en el organismo se necesita de la actuación sincronizada de los sistemas antioxidantes citados, SOD Cu-Zn, SOD Mn, Catalasa así como de las enzimas del sistema del glutati6n, GPx1 y GSR

con la colaboración de la G6PDH, enzima que retroalimenta positivamente a la GSR abasteciéndole de NADPH procedente de la ruta de las pentosas fosfato y actuando sobre la reducción del GSH. Resulta interesante comprobar como en la hipertensión se produce una respuesta inadecuada de las enzimas antioxidantes ya que la cuantificación de la expresión de las enzimas encargadas de dicha defensa se encuentran significativamente disminuidas en el caso de SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1, GSR y G6PDH respecto del grupo control (Chaves 2006) (artículo en prensa).

La prueba de la existencia de una respuesta inadecuada de dichos mecanismos de protección se apoya en los bajos niveles de ARNm de las enzimas, a pesar del incremento de estrés oxidativo, y a la reducida actividad enzimática de los hipertensos sin tratamiento. Hasta ahora el aumento de estrés oxidativo en la hipertensión se ha atribuido a la sobreactividad de los mecanismos que incrementaban la producción de ROS. Este aumento en el estrés oxidativo inducido por los ROS, principalmente mediado por los radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxil (OH) se produce en la hipertensión humana y en una gran variedad de modelos de hipertensión en animales (Dobrian 2001; Wu 2002; Reckelhoff 2003). En la hipertensión, el superóxido, es uno de los ROS más activo en la pared vascular, capaz de reducir la biodisponibilidad de NO gracias a su alta afinidad química para combinarse entre sí produciendo peroxinitrito,

potente oxidante y fuente constante de radical hidroxilo activo (Ignarro 2000).

Una explicación para los altos niveles de estrés oxidativo observados en los pacientes hipertensos es la existencia de una discapacidad en la actividad de enzimas antioxidantes. Los sistemas antioxidantes (SOD, Catalasa, y enzimas del sistema del glutati6n) constituyen y representan una parte importante del total de actividades antioxidantes de las c6lulas aer6bicas. Las enzimas con menor actividad en lugar de inducirse en situaciones de EO podrían degradarse por su propia actividad (o inactividad en este caso), ya que cada una de estas enzimas es susceptible a la inactivaci6n por ROS (Pigeolet 1990) y a la oxidaci6n para su posterior degradaci6n por el proteosoma (Davies 1987; Salo 1990; Pigeolet 1991). Adem6s, los ROS directamente o productos derivados de ellos, regulan la expresi6n de los genes antioxidantes y otros como parte de la respuesta adaptativa (Dalton 1999; Morel 1999).

La reducida actividad de la SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1 y GSR puede ser, en parte, una consecuencia de la inactivaci6n enzim6tica e inducci6n de su degradaci6n por sus propios productos (Cabelli 1989) u otros radicales libres (Grune 1998), y los niveles de ARNm observados en la hipertensi6n (resultados pertenecientes a la tesis doctoral de M^a Luisa Mansego) pueden explicarse por la existencia de una defectuosa respuesta en la expresi6n de estos genes, ya que las modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales que sufren dichas prote6inas no parecen desempeñar un papel importante en su funcionalidad; podría ser

que las enzimas con menor actividad en lugar de inducirse en situación de EO, puedan degradarse por su propia actividad. En este sentido, la regulación "a la baja" que sufre la SOD Cu-Zn ha sido descrito en otras condiciones con aumento de estrés oxidativo, como en riñón e hígado de rata con fallo renal crónico inducido por reducción de la masa renal (Varizi 2003).

Aunque en este estudio no se ha medido la SOD Cu-Zn extracelular, hemos valorado su expresión en las células mononucleares resultando ser ésta baja o no expresarse. La actividad SOD Cu-Zn extracelular sigue una tendencia parecida a la observada para la SOD Cu-Zn intracitoplasmática en las células mononucleares de sujetos hipertensos (Redon 2003). Consecuentemente, parece ser probable que el comportamiento de esta importante enzima antioxidante extracelular seguirá una tendencia parecida en otras células u órganos.

En contraste con el comportamiento de la SOD Cu-Zn observado en la hipertensión, la actividad de la SOD Mn, la superóxido dismutasa mitocondrial, está incrementada en los pacientes hipertensos respecto del grupo control. Esta diferencia entre ambas enzimas no es inesperada ya que se encuentran localizadas en compartimentos distintos, y la agresión oxidativa a la que se exponen también. Al igual que la SOD Mn, en los pacientes hipertensos también se encuentra incrementada la actividad Tiorredoxina en comparación con el grupo control.

Hay 2 formas de G6PDH; la forma G está ligada al cromosoma X y la forma H, codificada por el mismo gen, tiene herencia autosómica. Se han descrito más de 300 variantes humanas de la enzima basada en las características bioquímicas (Luzzato 1987; Beutler 1991), y dichas variantes se han categorizado aproximadamente en 30 grupos de mutaciones (Beutler 1992; Vulliamy 1992). Estas mutaciones ocurren en todo el gen, encontrándose en todos los exones excepto en los exones 3 y 13.

La cuantificación de la expresión de la G6PDH en el grupo HTA demuestra que su capacidad para retroalimentar de NAPDH a las enzimas del sistema del glutati6n de las células mononucleares de la sangre periférica, es muy limitada, presentando niveles de expresión muy inferiores a los del grupo control.

La defectuosa actuación de los mecanismos antioxidantes citos6licos, SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1, GSR y G6PDH, podría significar que los hipertensos son más sensibles al da6o producido por el estr6s oxidativo. Si esto se asocia a un incremento en los procesos generadores de ROS, la consecuencia es un marcado desequilibrio redox.

Estos datos indican que los hipertensos sin tratamiento tienen un m6ximo de expresión de estas enzimas en respuesta a un incremento en los niveles de estr6s oxidativo, sin embargo, 6stos no son suficientes para el control de la sobreproducci6n de ROS.

OTRAS ENFERMEDADES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: la hipercolesterolemia es un desorden clínico común, metabólico y/o genético, que promueve el daño funcional y estructural de la pared vascular. El mecanismo subyacente de estos efectos deletéreos, incluye una respuesta local inflamatoria y la liberación de citoquinas y factores de crecimiento. La consecuente activación de los mecanismos sensibles de oxidación en la pared vascular, la modulación de las vías de señalización intracelular, el incremento de oxidación de las lipoproteínas LDL y el secuestro de NO, pueden todos los factores perjudicar las funciones controladas por la pared vascular y conducir al desarrollo de aterosclerosis (Napoli 2001).

En relación con los resultados del estudio realizado en pacientes de HF y HFC podemos comprobar como ambos grupos patológicos están sometidos a la influencia del estrés oxidativo en su sistema vascular. Si comparamos entre sí los parámetros oxidativos de los pacientes dislipémicos con los hipertensos sin tratamiento comprobamos que son éstos últimos los que poseen valores más elevados en los marcadores de estrés oxidativo. El cociente entre GSSG/GSH%, que nos indica el daño oxidativo global (Bannister 1990), es significativamente más bajo en los grupos dislipémicos y los valores de PAO significativamente más altos. Al visualizar los productos derivados del ataque oxidativo, vemos que tanto el MDA como la carbonilación de proteínas de ambos grupos son significativamente bajos respecto de HTA pero no con el grupo control.

Sin embargo, los valores de 8-oxo-dG nuclear en las tres patologías presentan valores parecidos entre sí; el análisis de los niveles de ARNm de la OGG1 podría indicarnos que los tres grupos poseen casi inhibida la expresión de dicho gen, es decir, inhibida la función de reparación de lesiones oxidativas al ADN en el que participa dicha proteína y una acumulación de bases oxidadas en el ADN.

La producción total de nitratos no presenta significación estadística entre los grupos, aunque los valores más elevados los presentan las dislipemias; la actividad tiorredoxina está aumentada en las tres patologías, si bien, dicha activación es mucho más acentuada en HTA.

El estudio de las actividades enzimáticas encargadas de la defensa antioxidante en los pacientes de HFC y HF muestra que SOD Cu-Zn, Catalasa, GPx1 y GSR poseen valores de actividad por debajo del grupo control, pero en ninguno de los casos por debajo de HTA. Por el contrario, la actividad Xantina Oxidasa presenta valores más elevados en los pacientes de dislipemias, si bien, no se encuentran diferencias estadísticas entre grupos.

Al comparar la expresión de la G6PDH en estos dos grupos vemos que, al contrario de lo que pasa en la HTA, los pacientes dislipémicos poseen niveles iguales o superiores a la expresión que presenta el grupo control; quizás esta diferencia en el aporte de NADPH, generado por la G6PDH en

la ruta de las pentosas fosfato, para la reducción del GSSG por la GSR, sea determinante en la diferencia de valores del GSSG observada entre los pacientes dislipémicos y HTA; consecuentemente el grado de oxidación global (GSSG/GSH%) en ambos grupos es muy inferior al presentado por HTA, al igual que la gran mayoría de los parámetros medidos en esta investigación.

Al analizar en los grupos de dislipemias la significación estadística de la correlación de Pearson entre los niveles de glucosa basal y colesterol total con los metabolitos del EO comprobamos que en los HF tan sólo existe significación positiva entre la glucosa basal y la catalasa. Por el contrario, los HFC poseen significación estadística, en todos los casos con valores de Pearson negativos, entre el colesterol total y GSSG, GSSG/GSH%, 8-oxo-dG nuclear y la SOD Cu-Zn.

Por último, queda analizar la cuantificación de los niveles de ARNm de las enzimas encargadas de la defensa antioxidante y en cada una de ellas encontramos un patrón de expresión diferente; la SOD Cu-Zn presenta una disminución importante en los HF pero sin embargo en los HFC la expresión se iguala a la del grupo control. En la Catalasa, los HFC también alcanzan valores superiores que el grupo control y los HF casi igualan al resultado del grupo control.

El comportamiento de los niveles de expresión de la GPx1 en las dislipemias, HFC y HF, presenta un patrón similar para ambas patologías,

con valores significativamente menores que los encontrados para el grupo control y la HTA. La expresión de la GSR muestra que las dos patologías poseen valores disminuídos respecto del grupo control pero aumentados si los comparamos con la HTA.

El estudio de daño oxidativo en las células mononucleares de los pacientes con patologías de alto riesgo cardiovascular nos revela que dicho daño se produce de manera importante en diferentes compartimentos celulares, viéndose afectadas por el aumento de ROS y la disminución de los mecanismos antioxidantes, tanto las células encontradas en la circulación sanguínea, como las células de la pared endotelial; sin embargo, el impacto de éste efecto en las células de la pared endotelial es difícil de establecer entre las diferentes patologías.

Resumiendo, podemos afirmar que los pacientes de las enfermedades de alto riesgo cardiovascular estudiadas presentan una alteración de los niveles de EO con valores elevados respecto del grupo control. Consecuentemente las actividades enzimáticas tienen disminuída su eficiencia y los niveles de ARNm también por debajo de los del grupo control, por lo que podemos afirmar que estos pacientes se encuentran desprotegidos respecto al metabolismo oxidativo.

En los tres sistemas de EO crónicos estudiados, dicho EO altera totalmente la respuesta esperada y posiblemente los sistemas se estén

expresando al máximo: podemos concluir que los pacientes están desprotegidos frente al EO.

Lo que sí queda claro en este estudio es la implicación del estrés oxidativo en las enfermedades de alto riesgo cardiovascular y en el mayor riesgo aterogénico que sufren estos enfermos, y aunque el significado clínico de este fenómeno no sea bien conocido, nos acercamos al planteamiento de nuevas terapias que puedan equilibrar situaciones de estrés oxidativo. Sin embargo, en este intento de dilucidar la patogenia bioquímico-molecular que implica al estrés oxidativo en las patologías con alto riesgo cardiovascular, queda un largo camino hasta conocer los factores implicados en la desregulación de las enzimas antioxidantes, y así se podrá intervenir sobre ellos e intensificar la expresión de la defensa antioxidante.

CONCLUSIONES

- *1) En las tres patologías seleccionadas, HTA, HF y HFC, los resultados obtenidos sugieren que el EO representa un mecanismo común y subyacente en la patogenicidad de dichos procesos y posiblemente contribuya al desarrollo de complicaciones cardiovasculares, si bien, el mecanismo bioquímico-molecular responsable del proceso oxidativo presenta características diferenciales entre ellas, así como la intensidad de respuesta al EO.*

- *2) Los niveles elevados de EO en éstas patologías no dependen exclusivamente de un aumento en su producción ya que existe una menor actividad antioxidante. La disminución de los mecanismos antioxidantes se debe principalmente a:*
 - *Actividad reducida de los genes antioxidantes y del sistema GSH.*
 - *Menores niveles de ARNm, disminuyendo así su capacidad de producir enzimas y sistemas protectores frente a EO.*

- *3) Los pacientes de HTA sin tratamiento se encuentran peor protegidos frente a EO que los controles, a pesar de la activación de algunos sistemas antioxidantes como el sistema Tiorredoxina y la enzima Manganeso Superóxido Dismutasa.*

- *4) Los pacientes de HTA con y sin síndrome metabólico asociado no presentan diferencias significativas entre sí, lo que nos confirma que es la HTA el factor asociado al estrés oxidativo, siendo indiferentes las otras características que determinan el diagnóstico de síndrome metabólico.*
- *5) En los pacientes de HTA, ninguno de los parámetros de estrés oxidativo analizados se correlaciona significativamente con la microalbuminuria; del mismo modo tampoco presenta diferencias en cuanto al sexo ninguno de los parámetros analizados de los pacientes hipertensos. El análisis de los resultados por rango de edades revela que tan sólo existen diferencias en la cuantificación de la 8-oxo-dG mitocondrial de los hipertensos, siendo el grupo más joven el que presenta valores más elevados de la base oxidada.*
- *6) La hipertensión arterial progresa con una marcada oxidación del material genético que se verifica por el aumento en la producción de la base modificada y mutagénica 8-oxo-dG como resultado del estrés oxidativo y de la disminución de enzima reparadora OGG1 en las células mononucleares de los pacientes hipertensos.*

- *7) De los marcadores analizados, la liberación de 8-oxo-dG en orina es el parámetro más representativo del estrés oxidativo en la hipertensión arterial.*
- *8) En los pacientes de HFC se han encontrado correlaciones significativas entre el colesterol total y los metabolitos del EO, GSSG, GSSG/GSH%, 8-oxo-dG nuclear y la actividad SOD Cu-Zn. En los HF la correlación con significación se da entre la glucosa basal y la actividad Catalasa.*
- *9) Los tres modelos de EO crónico analizados poseen un aumento en los niveles de EO pero distinta intensidad en su respuesta. Los pacientes se encuentran desprotegidos frente al EO.*

BIBLIOGRAFÍA

(2003). *Patogenia de la aterosclerosis. Revista Clínica Española* 203(Extr.3): 3-11.

Abu-Zidan, F. W., CC Bonham, MJD Simovic, MO Buss, H Windsor, JA (1999). "Small bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidized protein in rats." *Eur J Surg* 165: 383-389.

Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol* 105: 121-6.

Allard, J. P., E. Aghdassi, et al. (1998). "Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection." *Am J Clin Nutr* 67(1): 143-7.

Ames, B. C., R Schwiers, E Hochstein, P (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.

Antonini, E. B., M Greenwood, C Malmström, BG (1970). "Catalytic mechanism of cytochrome oxidase." *Nature* 228: 936-937.

Auchère, F. a. C.-B., C. (2001). "Oxidation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system: functional and structural effects." *Free Radic Res* 36: 1185-1198.

Babior, B. (1978). "Oxygen dependent microbial killing by phagocytes." *N England J Med.* 298: 659-668.

Babior, B. (1978). "Oxygen dependent microbial killing by phagocytes." *N Eng J Med* 298: 721-725.

Babior, B. a. P., WA (1981). "The O₂ .- -producing enzyme of human neutrophils: further properties." *J Biol Chem* 256: 2321-2323.

Babior, B. K., RS Curnutte, JT (1973). "The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." *J Clin Invest* 52: 741-744.

Barbara, S. S., B Stadtman, ER (1997). "Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress." *The Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20313-20316.

Bannister, W Bannister, JV (1990) *Free radical and thiol compound. The role of glutathione against free radical toxicity.* Florida, CRC Press Inc.

Barquinero, J., Ed. (1992). *Radicales libres: los enemigos más diminutos. GSH system. Glutathión: Eje de la defensa antioxidante.* Amsterdam, Excerpta Médica .

Becker, B. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radic Biol Med* 14: 615-631.

Berlett, B. S., ER (1997). "Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress." *The Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20313-20316.

Beutler, E (1992) *The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects.* *Annu. Rev. Med* 43:47-59

Beutler, E (1991) *Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency.* *New England J Med* 324 169-174.

Bialkowski, K. K., KS (1998). "A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity." *Nucl.Acids Res* 26: 3194-3201.

Blake, D. R., RE Lunec, J (1987). "Free radical in biological system-a review orientated to inflammatory processes." *Br Med Bull* 45: 371-385.

Boiteux, S. R., P (2000). "The human OGG1 Gene:Structure, Functions, and its implication in the Process of Carcinogenesis." *Archives oh Biochemistry and Biophysics* 377(1): 1-8.

Bonora, E. K., S Willeit ,J et al. (1998). "Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study." *Diabetes* 47: 1643-1649.

Bouziane, M. M., F Bate, SE Somsouk, L Sang, BC Denissenko, M O'Connor, TR (2000). "Promoter structure and cell cycle dependent expression of the methylpurine-DNA glycosylase gen." *Mutat. Res.* 461: 15-29.

Boveris, A. A., SL Alvarez, S Costa, LE Valdez, L (2000). *The mitochondrial production of free radicals.*

Boveris, A. C., B (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* 134: 707-716.

Bulkley, G. (1983). "The role of oxygen free radical in human disease processes." *Surgery* 94: 407-411.

Burton, G. (1989). "Antioxidant action of carotenoids." *J Nutr* 119: 109-111.

Buss, H., T. P. Chan, et al. (1997). "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method." *Free Radic Biol Med* 23(3): 361-6.

Cabelli, D. A., D Bielski, BH Holcman, J (1989). "The interaction between Cu(I) superoxide dismutase and hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 264: 9967-9971.

Cadet, J. R., JL Buchko, GW Yeo, HC and Ames, BN. (1994). "Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products." Methods Enzymol. 234: 79-88.

Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res 87(10): 840-4.

Ceriello, A., N. Bortolotti, et al. (1997). "Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients." Diabetes Care 20(10): 1589-93.

Channon, K. G., TJ (2002). "Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetics risk factors. ." J Physiol Pharmacol 53: 515-524.

Chaves, F. M., ML Blesa, S González-Albert, V Jiménez, J Tormos, MC Espinosa, O Giner, V Iradi, A Sáez, GT Redon, J (2006). "Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension ".

Chen, S. H., A Tsai, M Chen, C Hong, A Wei, Y Chang, W (2003). "Age-associated Decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging." J. Radiat. Res 44: 31-35.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.

Cochrane, C. (1991). Cellular injury by oxidants, Am J Med.

Cooke, M. E., MD Burd, RM Patel, K Barmad, A Lunec, J (2001). "Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-

deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. ." *J Invest Dermatol* 116: 281-285.

Cooke, M. E., MD Herbert, KE Lunec, J (2000). "Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine- source, significance and supplements." *Free Radic Res* 32: 381-97.

Crystal, R. (1991). "Oxidants and antioxidants. Pathophysiological determinants and therapeutic agents: Introduction." *Am J Med* 91(15).

Cuadras, C. M., B. Echevarría, et al. (1991). *Fundamentos de estadística, Aplicación a las ciencias humanas.*

Cudd, A. F., I (1982). "Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase." *J Biol Chem* 257: 11443-11447.

Dandona, P. A., A Chaudhuri, A et al. (2005). "Metabolic Syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation." *Circulation* 111: 1448-1454.

Dantzer, F. L., L Bjoras, M Seeberg, E (2002). "Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo." *Nucl.Acids Res* 30: 2349-2357.

Davies, K. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J Biol Chem* 262: 9895-9901.

Del Maestro, R. (1980). "An approach to free radical in medicine and biology." *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 153-158.

Dickinson, D. F., HJ (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." *Biochemical Pharmacology* 64: 1019-1026.

Dobrian, A. D., MJ Schriver, SD Lauterio, TJ Prewitt, RL (2001). "Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension." Hypertension 37(2 part 2): 554-560.

Drexler, H. (1997). "Endothelial dysfunction: clinical implications." Prog Cardiovasc Dis 39: 287-324

Endemann, D. S., E (1983-1992, 2004). "Endothelial Dysfunction." J Am Soc Nephrol 15.

Espinosa, O. Jiménez-Almazán, J. Chaves, FJ. Tormos, MC. Clapes, S. Iradi, A. Salvador, A. Fandos, M Redón, J. Sáez, G (2007). "Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension" Free Radical Research.

Epstein, F. (1999). "Atherosclerosis-an inflammatory disease." N Eng J Med 340(2): 115.

Evans, M. D., M Cooke, MS (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutat. Res. Rev. 567: 1-61.

Fenster, B. T., PS Rockson, SG (2003). "Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress." Am Heart J 146: 218-226.

Ferrán Aranaz, M. (2001). SPSS para Windows. Análisis Estadístico Madrid.

Ferroni, P. B., S Falco, A Davi, G (2004). "Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia." Antioxidants & Redox Signalling 6(4): 687-690.

Ferroni, P. B., S Paoletti, V Davi, G (2006). "Endothelial dysfunction and oxidative stress an arterial hypertension." Nutricion, Metabolism&Cardiovascular Diseases 16(222-233).

Filomeni, G. R., & Ciriolo, MR (2002). "Cell signalling and the glutathione redox system." Biochem Pharmacol 64: 1057-1064.

Floid, R. (1995). Measurement of oxidative stress in vivo. Cleup, Cleup University Press.

Foot, C. C., YC (1970). "Chemistry of singlet oxygen. Carotenoid quenching parallels biological protection " J Am Chem Soc 92: 5216-5218.

Fossati, P., L. Prencipe, et al. (1980). "Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine." Clin Chem 26(2): 227-31.

Freeman, B. C., JD. (1982). "Biology of disease. Free radical and tissue injury." Lab Invest 47: 412-426.

Frenkel, K., Z. J. Zhong, et al. (1991). "Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo." Anal Biochem 196(1): 126-36.

Fridovich, I. (1970). "Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase." J Biol Chem 245: 4053-4057.

Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense." Science 201: 875-880.

Fridovich, I. (1983). "Superoxide radical: An endogenous toxicant." Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 239-257.

Gimbrone, J. M. (1995). "Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherogenesis." Am J Cardiol 75(67B-70B).

Gokce, N. K., JF Vita, JA (1998). Endotheliopathies: clinical manifestations of endothelial dysfunction. Baltimore.

Granger, D. G., MB Kvietys, PR. (1994). Mechanism of microvascular injury. New York.

Greenwald, R. M., WW (1980). "Effect of oxygen-derived free radical on hyaluronic acid." Arthritis Rheum 23: 455-463.

Griendling, K. F., GA (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation 108: 1912-1916.

Grum, C. G., TJ Mody, CH Sitrin, RG (1990). "Expression of xanthine oxidase activity by murine leucocytes." J Lab Clin Med 116: 211-218.

Grune, T. R., T Davies, KJA (1997). "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells." FASEB J 11: 526-534.

Grune, T. S., WG Kowalewski, J Esterbauer, H (1994). "Postischemic accumulation of the lipids peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine." Life Sci 55: 693-699.

Gupta, R. C. (1984). "Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 81(22): 6943-7.

Gutteridge, J. (1995). "Lipids peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem 41: 1819-1828.

Gutteridge, J. W., S. (1983). "Cooper salt-dependent hydroxyl radical formation damage to proteins acting as antioxidant." Biochem Biophys Acta 759: 38-41.

Haber, F. W., J. (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proc R Soc Lond Ser A 147: 332-351

Haffner, S. M., L Festa, A et al. (2000). "Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulinsensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." *Circulation* **101**: 975-980.

Hagiwara, A. K., Y Sato, S Miyazaki, K (2005). "Allelic loss of the DNA repair gene *OGG1* against oxidative damage in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* **13(6)**: 1009-1016.

Halcox, P. S., WH Zalos, G : (2002). "Prognostic value of coronary vascular endothelial function." *Circulation* **106**: 653-8.

Haller, H. (1997). "Endothelial function. General consideration." *Drugs* **53**: 1-10

Halliwell, B. (1978). "Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase." *Cell Biol Int Rep* **2**: 113-128.

Halliwell, B. (1994). "Free radical, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?" *Lancet* **344**: 714-721.

Halliwell, B. G., JMC (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* **280**: 1-8.

Halliwell, B. G., MC. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem J* **219**: 1-14.

Halliwell, B. R., R Wong, SF Gutteridge, JMC. (1980). The biological significance of the Haber-Weiss reaction. *Developments in Biochemistry. Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase.* W. a. B. Bannister, JV New York.: **11B**: 32-40.

Halliwell, B., Ed. (1991). *Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry and role in human disease. Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants; Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.*

Hansson, L. (1999). ". The Hypertension Optimal Treatment study and the importance of lowering blood pressure." *J Hypertens Suppl 17: 59-513.*

Harrison, D. G., KK Landmesser, U Hornig, B Drexler, H (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." *Am J Cardiol 91: 7A-11A.*

Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are the now?" *Free Radic Biol Med 33: 774-797.*

Hassan, M. F., I (1980). *Superoxide dismutases: detoxication of a free radical. London, Academic Press Inc.*

Heinecke, J. (2003). "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis." *Am J Cardiol 91: 12A-6A.*

Heitzer, T. B., C Mayer, B Wamholtz, A Mollnan, H Hennes, S (2000). "Tetrahydrobiopterina improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase " *Circ Res 86: E36-E41.*

Higuchi, M. and F. Yoshida (1977). Lowry determination of protein in the presence of sulfhydryl compounds or other reducing agents. *Anal Biochem. 77: 542-7.*

Hille, R. N., T (1995). "Xanthine oxidase and xanthine deshydrogenase." *FASED J 9: 995-1003.*

Hodgson, E. F., I (1975). "The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme." *Biochemistry 14: 5294-5299.*

Holmgren, A. and M. Bjornstedt (1995). "Thioredoxin and thioredoxin reductase." Methods Enzymol 252: 199-208.

Ignarro, L. (2000). Nitric Oxide. San Diego.

Iida, T Furuta, A. N., K Nakabeppu, Y Iwaki, T (2002). "Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain." Acta Neuropathol (Berl) 103(1): 20-25.

Inagami, T. N., M Hoover, R (1995). "Endothelium as an endocrine organ." Annu Rev Physiol 57: 171-189.

Irani, K. (2000). "Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." Circ Res 87: 179-183.

Jackson, A. L., LA (2001). "The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer" Mutation Research 477: 7-21

JAMA (2001). "Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)." 285: 2486-2497.

Johnston, R. G., CA Cohn, ZA (1978). "Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages." J Exp Med 148: 115-127.

Kannel, W. (1976). "Components of blood pressure and risk of atherothrombotic brain infarction: the Framingham study." Stroke 7: 327-331.

Karlsson, K. S., J Edlund, T Marklund, SL (1993). "Pharmacokinetics of extracellular superoxide dismutase in the vascular system." *Free Radic Biol Med* 14: 185-190.

Keith, M., A. Geranmayegan, et al. (1998). "Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure." *J Am Coll Cardiol* 31(6): 1352-6.

Keller, G. W., TG Steimer, KS Hallewell, RA (1991). "Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblast and hepatoma cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7381-7385.

Kellogg, E. I. F., I. . . : (1975). "Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. ." *J Biol Chem* 250: 8812-8817.

Kletzien, R. H., P Foellmi, A (1994). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress." *FASED J* 8: 174-181.

Klug, D. R., J Fridovich, I (1972). "A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis." *J Biol Chem* 247: 4839-4842.

Kojda, G. H., D (1999). "Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure." *Cardiovasc Res* 43(562-571).

Kono, Y. F., I (1982). "Superoxide radical inhibits catalase." *J Biol Chem* 257: 5751-5754.

Krinsky, N. (1989). "Antioxidant functions of carotenoids." *Free Radic Biol Med* 7: 617-635.

Kunsch, C. M., RM (1999). "Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature." *Circ Res* 85: 753-766.

Lander, H. M. (1997). "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction." *Faseb J* 11(2): 118-24.

Latorre, A., A. Moya, et al. (1986). "Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8649-8653.

Lefkowitz, R. J. and J. T. Willerson (2001). "Prospects for cardiovascular research." *Jama* 285(5): 581-7.

Li, C. J., RM (2002). "Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury." *Am J Physiol* 282: C227-C241.

López Alonso, M. M., M Hernandez, J Castillo, C Benedito, JL (1997). "Glutathion peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes." *Arch Met Vet* 29: 171-180.

Lunec, J. M., N Chauhan, D Capper, G Zheng, Q (2001). "Development of a quality control material for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. An in vivo marker of oxidative stress and comparison of results from different laboratories." *Free Radic Res* 33: 527-531.

Luzzato, L. (1987). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: genetic and hematological aspect." *Cell Biochem.Funct* 5: 101-107.

Margulis, L. (1986). *Evolución y células El origen de la célula.*

Marklund, S. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species " *Biochem J* 222: 649-655.

Marklund, S. (2002). "Extracellular superoxide dismutase." *Methods Enzymol* 349: 74-80.

Marquez, M. Y., C Sutil- Naranjo, R et al (2002). "Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A." *Invest. Clin Set* 43(3): 191-204.

Marquina, E. (2000). *Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas*. Valencia, Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.

Martínez, C. S. d. M., F (2001). *Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante*. Madrid.

Massey, V. and C. H. Williams, Jr. (1965). "On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase." *J Biol Chem* 240(11): 4470-80.

McCord, J. (1983). "The superoxide free radical; its biochemistry and pathophysiology." *Surgery* 94: 412-414.

McCord, J. (2002). "Superoxide dismutase in aging and disease: An overview." *Methods Enzymol* 349: 331-341.

McCord, J. D., D Jr (1978). "Superoxide dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron EDTA complex." *FEBS Lett* 86: 139-142.

McCord, J. F., I (1968). "The reduction of cytochromo C by milk xanthine oxidase." *J Biol Chem* 243: 5753-5760.

McCord, J. F., I (1969). "Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244: 6049-6055.

Meneshian, A. B., GB (2002). "The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injure to inflammatory signal transduction." *Microcirculation* 9: 161-175.

Milton, J. S. (1998). *Estadística para la Biología y Ciencias de la Salud*. Madrid.

Miquel, J. E., AC Fleming, JE Jonhson, JE (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp. Gerontol* 15: 575.

Miranda-Vizueté, A., CM Jiménez, A Krause, WJ Sutovsky, P Oko, R (2004). "The Mammalian Testis-Specific Thioredoxin System." *Antioxidants & Redox Signalling* 6(1): 25-40.

Mo, J. M., H Sekiguchi, M (1992). "Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18kDa protein, sanitization of the nucleotide pool " *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11021-11025.

Moncada, S. H., EA (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Eng J Med* 329: 2002-2012.

Moncada, S. P., RM Higgs, EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Morel, Y. B., R (1999). "Repression of gene expression by oxidative stress." *Biochem J* 342: 481-496.

Muniz, P., V. Valls, et al. (1995). "The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage." *Free Radic Biol Med* 18(4): 747-55.

Nakabeppu, Y. T., D Ichinoe, A Ohno, M Ide, Y Hirano, S Yoshimura, D Tominaga, Y Furuichi, M, Sakumi, K (2004). "Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species. From Mitochondria to Nucleo." *Ann NY Acad Sci* 1011: 101-111.

Napoli, C. L., LO (2001). "Involvement of oxidation-sensitive mechanism in the cardiovascular effects of hypercholesterolemia." *Clin Proc* 76: 619-631.

Nappi, A. V., E. (2000). "Interactions of iron with reactive intermediates of oxygen and nitrogen." *Dev Neurosci*. 24: 134-142.

Nathan, C. X., QW (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." *J Biol Chem* 269: 13725-13728.

Navarro, J., E. Obrador, et al. (1997). "Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans." *Free Radic Biol Med* 22(7): 1203-9.

Nebot, C., M. Moutet, et al. (1993). "Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol." *Anal Biochem* 214(2): 442-51.

Nelson, S. B., SK McCord, JM. (1994). "The toxicity of high dose superoxide dismutase suggest that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart." *Free Radic Biol Med* 16: 195-200.

Nicoletti A, Caligiuri G, Paulsson G, Hansson GK. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;138: 5438-43.

Nishino, T. (1994). "The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury." *J Biochem* 116: 1-6.

O'Donnell, C. (1997). "Hypertension and borderline isolated systolic hypertension increase risks of cardiovascular disease and mortality in male physicians. ." *Circulation* 95: 1132-1137.

Omar, B. G., NM Jordan, MC Striplin, SP Russell, WJ Downey, JM and McCord, JM. (1990). "Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. ." *Free Radic Biol Med* 9(465-471).

Packer, J. S., TF Willson, RL (1979). "Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C." Nature 278: 737-738.

Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1967). "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase." J Lab Clin Med 70(1): 158-69.

Palmer, R. F., AJ Moncada, S (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature 327: 524-526.

Palozza, P. K., NI (1992). "Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview." Methods Enzymol 213: 403-420.

Pardo Merino, A. and M. A. Ruiz Díaz (2000). SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid.

Parks, D. G., DN (1986). "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." Acta Physiol Scand Suppl 548(87-99).

Petrie JC, O. B. E., Littler WA, De Swiet M (1986). "British Hypertension Society. Recommendations on blood pressure measurement." Br. Med. J 293: 611-615.

Pigeolet, E. C., P Houbion, A Lambert, D Michiels, C Raes, M Zachary, MD Remacle, J (1990). "Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radical " Mech Ageing Dev 51: 283-297.

Pigeolet, R., J (1991). "Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals." Free Radic Biol Med 11: 191-195.

Porras, A. O., JC Palmer, G (1981). "The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen." J Biol Chem 256: 9096-9103.

prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." Circulation 101: 975-980.

Pryor, W. (1973). "Free radical reactions and their importance in biochemical system." Fed Proc 32: 1862-1869.

Pryor, W. S., GL (1995). "The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." Am J Physiol 268: L699-L722.

Ramos, C. P., S Britigan, BE Cohen, MS and Rosen, GM. (1992). "Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes." J Biol Chem 267: 8307-8312.

Rasmussen, B. B., K (1996). "Determination of urinary metabolites of caffeine for the assessment of cytochrome P4501A2, xanthine oxidase and N-acetyltransferase activity in humans." Ther Drug Monit 18 (3): 254-262.

Ratyck, R. C., RS Bulkley, GB (1987). "The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells." Surgery 102: 122-131.

Reckelhoff, J. R., JC (2003). "Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension." Am J Physiol Integr Comp Physiol 284: R893-R912.

Redon, J. e. a. (2003). ""Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension."" Hypertension 41(5): 1096-1101.

Riesz, P. K., T (1992). "Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications." Free Radic Biol Med 13: 247-270.

Rinaldo, J. C., M Parinello, J Shepherd, VL (1994). "Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon- γ stimulated macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol 11: 625-630.

Rodríguez Perón, J. V. G., JR (2002). "Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial." *Rev Cubana Med Milit* 31(4).

Rodríguez, J. M., JR Trujillo, LY (2001). "Radicales libres en biomedicina y estrés oxidativo." *Rev Cubana Med Milit* 30(1): 36-44.

Ronan K.Brown, A. M., Joe Lunec and Frank J.Kelly (1995). "Oxidative damage to DNA in Patients with cystic fibrosis." *Free Radic Biol Med* 18(4): 801-806.

Rosen, G. P., S Ramos, CL Cohen, MS Britigan, BE (1995). "Free radical and phagocytic cells." *FASED J* 9: 200-209.

Rosenquist, T. Z., DO Grollman, AP (1997). "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase." *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7429-7434.

Rossi, F. (1986). "The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanism of activation and function." *Biochem Biophys Acta* 853: 65-89.

Rowe, G. M., HN Caplan, M Hess, ML (1983). "Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cicloxygenase pathway." *Circ Res* 53: 584-591.

Sáez-Tormo, G. e. a. (2004). "Factors related to the Impact of Antihypertensive Treatment in Antioxidant Activities and Oxidative Stress By-products in Human Hypertension." *Am J Hypertens* 17: 809-816.

Sáez, G. (2005). *Biopatología de los radicales libres*. Madrid, Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.

Sáez, G. B., W Bannister, JV (1990). *Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity.* . Florida, CRC Press Inc.

Saini, H. A., AS Dhalla, NS (2004). "Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction." *Can J Cardiol* 20(3): 333-346.

Saitoh, T. S., K Yamaguchi, S Tani, M Seki, S Murakami, H Nojima, Y Yokota, J (2001). "Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein." *Mutat. Res.* 486: 31-40.

Salo, D. P., RE Lin, SW Giulivi, C Davies, KJ (1990). "Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation." *J Biol Chem* 265: 11919-11927.

Santini, S. A., G. Marra, et al. (1997). "Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM." *Diabetes* 46(11): 1853-8.

Santus, R. P., LK Filipe, P Morlière, P Hug, GL Fernandes, A Mazière, JC (2001). "Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions." *Free Radic Res* 35: 129-136.

Schüep, W. R., R (1994). "Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue:high performance liquid chromatography." *Methods Enzymol* 234: 294-302.

Segal, A. A., A (1993). "The biochemical basis of the NADPHoxidase of phagocytes." *TIBS* 18: 43-47.

Shepherd, P. K., BB (1999). "Glucose transporters and insulin action implications for insulin resistance and diabetes mellitus." *N Eng J Med* 341: 248-257.

Shigenaga, M. K. and B. N. Ames (1991). "Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage." Free Radic Biol Med 10(3-4): 211-6.

Shih, S. J., M Liu, N Smith, LE (2003). "Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity." J Clin Invest 112: 50-57.

Siems, W. G., T Esterbauer, H (1995). "4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine." Life Sci 57: 785-789.

Sies, H. (1985). Oxidative Stress. London.

Siggaard-Andersen, O. U., A Gothgen, IH (1995). "Classes of tissue hypoxia." Acta Anaesthresiol Scand 39: 137-142.

Slater, T. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." Biochem J 222: 1-15.

Sonnenberg, G. K., GR Kissebah, AH. (2004). "A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome." Obes Res 12: 180-186.

Southorn, F. P., G (1988). "Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions" Mayo Clin Proc 63: 381-389.

Stadtman, E. O., CN (1991). "Metal-catalyzed oxidation of protein. Physiological consequences." J Biol Chem 266: 2005-2008.

Stocker, R. G., AN Ames, BN (1987). "Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin." Proc Natl Acad Sci USA 84: 5918-5922.

Stralin, P. K., K Johansson, BO Marklund, SL (1995). "The interstitium of the human arterial wall contains very large amount of extracellular superoxide dismutase." Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 2032-2036.

Stroes, E. K., J Cosentino, F Erkelens, W Wever, R Koomans, H (1997). "Tetrahydrobiopterina restores endothelial function in hypercholesterolemia." J Clin Invest 99(41-46).

Stryer, L. (1995). Fosforilación oxidativa.

Stuehr, D. (1999). "Mammalian nitric oxide synthases." Biochem Biophys Acta 1411: 217-230.

Takao, M. A., H Kobayashi, K Yasui, A (1998). "Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage." Nucl.Acids Res 26: 2917-2922.

Tan, S. Y., Y Dickens, E Cash, TG Freeman, BA Parks, DA (1993). "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock." Free Radic Biol Med 15: 407-414.

Tian, W. B., L Apse, K Pang, J Rose, M Tian, X Stantion, R (1999). "Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death." Am.Physiological Soeciety 0363: C1121-C1131.

Townsend, D. T., K Tapiero, H (2003). "The importance of glutathione in human disease." Biomedicine&Pharmacotherapy 57: 145-155.

Trujillo, M., M. N. Alvarez, et al. (1998). "Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols." J Biol Chem 273(14): 7828-34.

Tubaro, E. L., B Santiangeli, C Cavallo, G (1980). "Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in the killing mechanism of polymorphonuclear leukocytes." Biochem Pharmacol 29: 3018-3020.

Turrens, J. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol 552: 335-344.

Umans, J. L., R (1995). "Nitric Oxide en the regulation of blood flow and arterial pressure." *Annu Rev Physiol* 57: 771-790.

Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." *Methods Enzymol* 252: 38-53.

Van, K. E. and W. G. Zijlstra (1961). "Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method." *Clin Chim Acta* 6: 538-44.

Varizi, N. N., M Ho, ND Boroujerdi-Rad, L Sindhu, RK (2003). "Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency." *Kidney Int* 63: 179-185.

Verma, S. A., TJ (2002). "Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist." *Circulation* 105: 546-549.

Vulliamy, T. M., P Luzzato,L (1992). "The moleculr basis of glucose-6-phosphate dehidrogenase deficiency." *Curr. Trends Genet* 8: 138-143.

Wannamethee, S. (2005). "Serum uric acid and risk of coronary heart disease." *Curr. Pharm Des* 11(32): 4125-4132.

Wang, W. B., N (1998). "Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions." *Pharmacol Rev* 50(3): 335-355.

Waud, W. R., KV (1976). "Purification and properties of the NAD+-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase." *Arch Biochem Biophys* 172: 354-364.

Waud, W. R., KV (1976). "The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD+-dependent (type D) to an O₂-dependent form (type O)." *Arch Biochem Biophys* 172: 365-379.

Weisiger, R. F., I (1973). "Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem 248: 4793-4796.

Weiss, S. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." N Eng J Med 320: 365-376.

Wolf, S. D., RT (1986). "Fragmentation of proteins by free radical and its effect on their susceptibility to enzymatic hydrolysis." Biochem J 234: 399-403.

Wolf, S. D., RT (1987). "Glucose oxidation and protein modification. The potential role of "autooxidative glycosilation" in diabetes." Biochem J 245: 243-250.

Wu, L. J., BH (2002). "Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertension rat vascular smooth muscle cells." Hypertension 39: 809-814.

Yamawaki, H. H., J Berk, BC (2003). "Thioredoxin: A Key Regulator of Cardiovascular Homeostasis." Circ Res 93: 1029-1033.

Yim, B. C., PB Stadtman, ER (1990). "Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide." Proc Natl Acad Sci USA 87: 5006-5010.

Yokoyama, Y. B., JS Beckman, TK Wheat, JK Cash, TG Freeman, BA Parks, DA (1990). "Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury." Am J Physiol 258: G564-G570.

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

BIBLIOGRAFÍA

(2003). *Patogenia de la aterosclerosis. Revista Clínica Española* 203(Extr.3): 3-11.

Abu-Zidan, F. W., CC Bonham, MJD Simovic, MO Buss, H Windsor, JA (1999). "Small bowel ischaemia-reperfusion increases plasma concentrations of oxidized protein in rats." *Eur J Surg* 165: 383-389.

Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol* 105: 121-6.

Allard, J. P., E. Aghdassi, et al. (1998). "Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection." *Am J Clin Nutr* 67(1): 143-7.

Ames, B. C., R Schwiers, E Hochstein, P (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6858-6862.

Antonini, E. B., M Greenwood, C Malmström, BG (1970). "Catalytic mechanism of cytochrome oxidase." *Nature* 228: 936-937.

Auchère, F. a. C.-B., C. (2001). "Oxidation of Cu,Zn-superoxide dismutase by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/chloride system: functional and structural effects." *Free Radic Res* 36: 1185-1198.

Babior, B. (1978). "Oxygen dependent microbial killing by phagocytes." *N England J Med.* 298: 659-668.

Babior, B. (1978). "Oxygen dependent microbial killing by phagocytes." *N Eng J Med* 298: 721-725.

Babior, B. a. P., WA (1981). "The O₂ .- -producing enzyme of human neutrophils: further properties." *J Biol Chem* 256: 2321-2323.

Babior, B. K., RS Curnutte, JT (1973). "The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent." *J Clin Invest* 52: 741-744.

Barbara, S. S., B Stadtman, ER (1997). "Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress." *The Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20313-20316.

Bannister, W Bannister, JV (1990) *Free radical and thiol compound. The role of glutathione against free radical toxicity.* Florida, CRC Press Inc.

Barquinero, J., Ed. (1992). *Radicales libres: los enemigos más diminutos. GSH system. Glutati6n: Eje de la defensa antioxidante.* msterdam, Excerpta Médica .

Becker, B. (1993). "Towards the physiological function of uric acid." *Free Radic Biol Med* 14: 615-631.

Berlett, B. S., ER (1997). "Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress." *The Journal of Biological Chemistry* 272(33): 20313-20316.

Beutler, E (1992) *The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects.* *Annu. Rev. Med* 43:47-59

Beutler, E (1991) *Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency.* *New England J Med* 324 169-174.

Bialkowski, K. K., KS (1998). "A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity." *Nucl.Acids Res* 26: 3194-3201.

Blake, D. R., RE Lunec, J (1987). "Free radical in biological system-a review orientated to inflammatory processes." *Br Med Bull* 45: 371-385.

Boiteux, S. R., P (2000). "The human OGG1 Gene:Structure, Functions, and its implication in the Process of Carcinogenesis." *Archives oh Biochemistry and Biophysics* 377(1): 1-8.

Bonora, E. K., S Willeit ,J et al. (1998). "Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: the Bruneck Study." *Diabetes* 47: 1643-1649.

Bouziane, M. M., F Bate, SE Somsouk, L Sang, BC Denissenko, M O'Connor, TR (2000). "Promoter structure and cell cycle dependent expression of the methylpurine-DNA glycosylase gen." *Mutat. Res.* 461: 15-29.

Boveris, A. A., SL Alvarez, S Costa, LE Valdez, L (2000). *The mitochondrial production of free radicals.*

Boveris, A. C., B (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen." *Biochem J* 134: 707-716.

Bulkley, G. (1983). "The role of oxygen free radical in human disease processes." *Surgery* 94: 407-411.

Burton, G. (1989). "Antioxidant action of carotenoids." *J Nutr* 119: 109-111.

Buss, H., T. P. Chan, et al. (1997). "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method." *Free Radic Biol Med* 23(3): 361-6.

Cabelli, D. A., D Bielski, BH Holcman, J (1989). "The interaction between Cu(I) superoxide dismutase and hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 264: 9967-9971.

Cadet, J. R., JL Buchko, GW Yeo, HC and Ames, BN. (1994). "Singlet oxygen DNA damage: chromatographic and mass spectrometric analysis of damage products." Methods Enzymol. 234: 79-88.

Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res 87(10): 840-4.

Ceriello, A., N. Bortolotti, et al. (1997). "Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients." Diabetes Care 20(10): 1589-93.

Channon, K. G., TJ (2002). "Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetics risk factors. ." J Physiol Pharmacol 53: 515-524.

Chaves, F. M., ML Blesa, S González-Albert, V Jiménez, J Tormos, MC Espinosa, O Giner, V Iradi, A Sáez, GT Redon, J (2006). "Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension ".

Chen, S. H., A Tsai, M Chen, C Hong, A Wei, Y Chang, W (2003). "Age-associated Decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging." J. Radiat. Res 44: 31-35.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.

Cochrane, C. (1991). Cellular injury by oxidants, Am J Med.

Cooke, M. E., MD Burd, RM Patel, K Barmad, A Lunec, J (2001). "Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-

deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. ." *J Invest Dermatol* 116: 281-285.

Cooke, M. E., MD Herbert, KE Lunec, J (2000). "Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine- source, significance and supplements." *Free Radic Res* 32: 381-97.

Crystal, R. (1991). "Oxidants and antioxidants. Pathophysiological determinants and therapeutic agents: Introduction." *Am J Med* 91(15).

Cuadras, C. M., B. Echevarría, et al. (1991). *Fundamentos de estadística, Aplicación a las ciencias humanas.*

Cudd, A. F., I (1982). "Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase." *J Biol Chem* 257: 11443-11447.

Dandona, P. A., A Chaudhuri, A et al. (2005). "Metabolic Syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation." *Circulation* 111: 1448-1454.

Dantzer, F. L., L Bjoras, M Seeberg, E (2002). "Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo." *Nucl.Acids Res* 30: 2349-2357.

Davies, K. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." *J Biol Chem* 262: 9895-9901.

Del Maestro, R. (1980). "An approach to free radical in medicine and biology." *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 153-158.

Dickinson, D. F., HJ (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." *Biochemical Pharmacology* 64: 1019-1026.

Dobrian, A. D., MJ Schriver, SD Lauterio, TJ Prewitt, RL (2001). "Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension." Hypertension 37(2 part 2): 554-560.

Drexler, H. (1997). "Endothelial dysfunction: clinical implications." Prog Cardiovasc Dis 39: 287-324

Endemann, D. S., E (1983-1992, 2004). "Endothelial Dysfunction." J Am Soc Nephrol 15.

Espinosa, O. Jiménez-Almazán, J. Chaves, FJ. Tormos, MC. Clapes, S. Iradi, A. Salvador, A. Fandos, M Redón, J. Sáez, G (2007). "Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension" Free Radical Research.

Epstein, F. (1999). "Atherosclerosis-an inflammatory disease." N Eng J Med 340(2): 115.

Evans, M. D., M Cooke, MS (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutat. Res. Rev. 567: 1-61.

Fenster, B. T., PS Rockson, SG (2003). "Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress." Am Heart J 146: 218-226.

Ferrán Aranaz, M. (2001). SPSS para Windows. Análisis Estadístico Madrid.

Ferroni, P. B., S Falco, A Davi, G (2004). "Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia." Antioxidants & Redox Signalling 6(4): 687-690.

Ferroni, P. B., S Paoletti, V Davi, G (2006). "Endothelial dysfunction and oxidative stress an arterial hypertension." Nutricion, Metabolism&Cardiovascular Diseases 16(222-233).

Filomeni, G. R., & Ciriolo, MR (2002). "Cell signalling and the glutathione redox system." Biochem Pharmacol 64: 1057-1064.

Floid, R. (1995). Measurement of oxidative stress in vivo. Cleup, Cleup University Press.

Foot, C. C., YC (1970). "Chemistry of singlet oxygen. Carotenoid quenching parallels biological protection " J Am Chem Soc 92: 5216-5218.

Fossati, P., L. Prencipe, et al. (1980). "Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine." Clin Chem 26(2): 227-31.

Freeman, B. C., JD. (1982). "Biology of disease. Free radical and tissue injury." Lab Invest 47: 412-426.

Frenkel, K., Z. J. Zhong, et al. (1991). "Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo." Anal Biochem 196(1): 126-36.

Fridovich, I. (1970). "Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase." J Biol Chem 245: 4053-4057.

Fridovich, I. (1978). "The biology of oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense." Science 201: 875-880.

Fridovich, I. (1983). "Superoxide radical: An endogenous toxicant." Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 239-257.

Gimbrone, J. M. (1995). "Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherogenesis." Am J Cardiol 75(67B-70B).

Gokce, N. K., JF Vita, JA (1998). Endotheliopathies: clinical manifestations of endothelial dysfunction. Baltimore.

Granger, D. G., MB Kvietys, PR. (1994). Mechanism of microvascular injury. New York.

Greenwald, R. M., WW (1980). "Effect of oxygen-derived free radical on hyaluronic acid." Arthritis Rheum 23: 455-463.

Griendling, K. F., GA (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation 108: 1912-1916.

Grum, C. G., TJ Mody, CH Sitrin, RG (1990). "Expression of xanthine oxidase activity by murine leucocytes." J Lab Clin Med 116: 211-218.

Grune, T. R., T Davies, KJA (1997). "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells." FASEB J 11: 526-534.

Grune, T. S., WG Kowalewski, J Esterbauer, H (1994). "Postischemic accumulation of the lipids peroxidation product 4-hydroxynonenal in rat small intestine." Life Sci 55: 693-699.

Gupta, R. C. (1984). "Nonrandom binding of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to repetitive sequences of rat liver DNA in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 81(22): 6943-7.

Gutteridge, J. (1995). "Lipids peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." Clin Chem 41: 1819-1828.

Gutteridge, J. W., S. (1983). "Cooper salt-dependent hydroxyl radical formation damage to proteins acting as antioxidant." Biochem Biophys Acta 759: 38-41.

Haber, F. W., J. (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts." Proc R Soc Lond Ser A 147: 332-351

Haffner, S. M., L Festa, A et al. (2000). "Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulinsensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." *Circulation* **101**: 975-980.

Hagiwara, A. K., Y Sato, S Miyazaki, K (2005). "Allelic loss of the DNA repair gene *OGG1* against oxidative damage in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* **13(6)**: 1009-1016.

Halcox, P. S., WH Zalos, G : (2002). "Prognostic value of coronary vascular endothelial function." *Circulation* **106**: 653-8.

Haller, H. (1997). "Endothelial function. General consideration." *Drugs* **53**: 1-10

Halliwell, B. (1978). "Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase." *Cell Biol Int Rep* **2**: 113-128.

Halliwell, B. (1994). "Free radical, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?" *Lancet* **344**: 714-721.

Halliwell, B. G., JMC (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* **280**: 1-8.

Halliwell, B. G., MC. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." *Biochem J* **219**: 1-14.

Halliwell, B. R., R Wong, SF Gutteridge, JMC. (1980). The biological significance of the Haber-Weiss reaction. *Developments in Biochemistry. Biological and Clinical Aspects of Superoxide and superoxide dismutase. W. a. B. Bannister, JV New York.* **11B**: 32-40.

Halliwell, B., Ed. (1991). *Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry and role in human disease. Proceedings of a symposium. Oxidants and antioxidants; Pathophysiologic determinants and therapeutic agents.*

Hansson, L. (1999). ". The Hypertension Optimal Treatment study and the importance of lowering blood pressure." *J Hypertens Suppl 17: 59-513.*

Harrison, D. G., KK Landmesser, U Hornig, B Drexler, H (2003). "Role of oxidative stress in atherosclerosis." *Am J Cardiol 91: 7A-11A.*

Harrison, R. (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are the now?" *Free Radic Biol Med 33: 774-797.*

Hassan, M. F., I (1980). *Superoxide dismutases: detoxication of a free radical. London, Academic Press Inc.*

Heinecke, J. (2003). "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis." *Am J Cardiol 91: 12A-6A.*

Heitzer, T. B., C Mayer, B Wamholtz, A Mollnan, H Hennes, S (2000). "Tetrahydrobiopterina improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase " *Circ Res 86: E36-E41.*

Higuchi, M. and F. Yoshida (1977). Lowry determination of protein in the presence of sulfhydryl compounds or other reducing agents. *Anal Biochem. 77: 542-7.*

Hille, R. N., T (1995). "Xanthine oxidase and xanthine deshydrogenase." *FASED J 9: 995-1003.*

Hodgson, E. F., I (1975). "The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: Inactivation of the enzyme." *Biochemistry 14: 5294-5299.*

Holmgren, A. and M. Bjornstedt (1995). "Thioredoxin and thioredoxin reductase." Methods Enzymol 252: 199-208.

Ignarro, L. (2000). Nitric Oxide. San Diego.

Iida, T Furuta, A. N., K Nakabeppu, Y Iwaki, T (2002). "Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain." Acta Neuropathol (Berl) 103(1): 20-25.

Inagami, T. N., M Hoover, R (1995). "Endothelium as an endocrine organ." Annu Rev Physiol 57: 171-189.

Irani, K. (2000). "Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling." Circ Res 87: 179-183.

Jackson, A. L., LA (2001). "The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer" Mutation Research 477: 7-21

JAMA (2001). "Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)." 285: 2486-2497.

Johnston, R. G., CA Cohn, ZA (1978). "Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages." J Exp Med 148: 115-127.

Kannel, W. (1976). "Components of blood pressure and risk of atherothrombotic brain infarction: the Framingham study." Stroke 7: 327-331.

Karlsson, K. S., J Edlund, T Marklund, SL (1993). "Pharmacokinetics of extracellular superoxide dismutase in the vascular system." *Free Radic Biol Med* 14: 185-190.

Keith, M., A. Geranmayegan, et al. (1998). "Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure." *J Am Coll Cardiol* 31(6): 1352-6.

Keller, G. W., TG Steimer, KS Hallewell, RA (1991). "Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblast and hepatoma cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7381-7385.

Kellogg, E. I. F., I. . . : (1975). "Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. ." *J Biol Chem* 250: 8812-8817.

Kletzien, R. H., P Foellmi, A (1994). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress." *FASED J* 8: 174-181.

Klug, D. R., J Fridovich, I (1972). "A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis." *J Biol Chem* 247: 4839-4842.

Kojda, G. H., D (1999). "Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure." *Cardiovasc Res* 43(562-571).

Kono, Y. F., I (1982). "Superoxide radical inhibits catalase." *J Biol Chem* 257: 5751-5754.

Krinsky, N. (1989). "Antioxidant functions of carotenoids." *Free Radic Biol Med* 7: 617-635.

Kunsch, C. M., RM (1999). "Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature." *Circ Res* 85: 753-766.

Lander, H. M. (1997). "An essential role for free radicals and derived species in signal transduction." *Faseb J* 11(2): 118-24.

Latorre, A., A. Moya, et al. (1986). "Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(22): 8649-8653.

Lefkowitz, R. J. and J. T. Willerson (2001). "Prospects for cardiovascular research." *Jama* 285(5): 581-7.

Li, C. J., RM (2002). "Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury." *Am J Physiol* 282: C227-C241.

López Alonso, M. M., M Hernandez, J Castillo, C Benedito, JL (1997). "Glutathion peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes." *Arch Met Vet* 29: 171-180.

Lunec, J. M., N Chauhan, D Capper, G Zheng, Q (2001). "Development of a quality control material for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. An in vivo marker of oxidative stress and comparison of results from different laboratories." *Free Radic Res* 33: 527-531.

Luzzato, L. (1987). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: genetic and hematological aspect." *Cell Biochem.Funct* 5: 101-107.

Margulis, L. (1986). *Evolución y células El origen de la célula.*

Marklund, S. (1984). "Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species " *Biochem J* 222: 649-655.

Marklund, S. (2002). "Extracellular superoxide dismutase." *Methods Enzymol* 349: 74-80.

Marquez, M. Y., C Sutil- Naranjo, R et al (2002). "Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A." *Invest. Clin Set* 43(3): 191-204.

Marquina, E. (2000). *Teoría de orbitales y oxígeno molecular: estructura electrónica del átomo de oxígeno y de las moléculas de oxígeno diatómicas*. Valencia, Ed: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.

Martínez, C. S. d. M., F (2001). *Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante*. Madrid.

Massey, V. and C. H. Williams, Jr. (1965). "On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase." *J Biol Chem* 240(11): 4470-80.

McCord, J. (1983). "The superoxide free radical; its biochemistry and pathophysiology." *Surgery* 94: 412-414.

McCord, J. (2002). "Superoxide dismutase in aging and disease: An overview." *Methods Enzymol* 349: 331-341.

McCord, J. D., D Jr (1978). "Superoxide dependent production of hydroxyl radical catalysed by iron EDTA complex." *FEBS Lett* 86: 139-142.

McCord, J. F., I (1968). "The reduction of cytochromo C by milk xanthine oxidase." *J Biol Chem* 243: 5753-5760.

McCord, J. F., I (1969). "Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244: 6049-6055.

Meneshian, A. B., GB (2002). "The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injure to inflammatory signal transduction." *Microcirculation* 9: 161-175.

Milton, J. S. (1998). *Estadística para la Biología y Ciencias de la Salud*. Madrid.

Miquel, J. E., AC Fleming, JE Jonhson, JE (1980). "Mitochondrial role in cell aging." *Exp. Gerontol* 15: 575.

Miranda-Vizueté, A., CM Jiménez, A Krause, WJ Sutovsky, P Oko, R (2004). "The Mammalian Testis-Specific Thioredoxin System." *Antioxidants & Redox Signalling* 6(1): 25-40.

Mo, J. M., H Sekiguchi, M (1992). "Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18kDa protein, sanitization of the nucleotide pool " *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11021-11025.

Moncada, S. H., EA (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." *N Eng J Med* 329: 2002-2012.

Moncada, S. P., RM Higgs, EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Morel, Y. B., R (1999). "Repression of gene expression by oxidative stress." *Biochem J* 342: 481-496.

Muniz, P., V. Valls, et al. (1995). "The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage." *Free Radic Biol Med* 18(4): 747-55.

Nakabeppu, Y. T., D Ichinoe, A Ohno, M Ide, Y Hirano, S Yoshimura, D Tominaga, Y Furuichi, M, Sakumi, K (2004). "Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species. From Mitochondria to Nucleo." *Ann NY Acad Sci* 1011: 101-111.

Napoli, C. L., LO (2001). "Involvement of oxidation-sensitive mechanism in the cardiovascular effects of hypercholesterolemia." *Clin Proc* 76: 619-631.

Nappi, A. V., E. (2000). "Interactions of iron with reactive intermediates of oxygen and nitrogen." *Dev Neurosci*. 24: 134-142.

Nathan, C. X., QW (1994). "Regulation of biosynthesis of nitric oxide." *J Biol Chem* 269: 13725-13728.

Navarro, J., E. Obrador, et al. (1997). "Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans." *Free Radic Biol Med* 22(7): 1203-9.

Nebot, C., M. Moutet, et al. (1993). "Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol." *Anal Biochem* 214(2): 442-51.

Nelson, S. B., SK McCord, JM. (1994). "The toxicity of high dose superoxide dismutase suggest that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart." *Free Radic Biol Med* 16: 195-200.

Nicoletti A, Caligiuri G, Paulsson G, Hansson GK. Functionality of specific immunity in atherosclerosis. *Am Heart J* 1999;138: 5438-43.

Nishino, T. (1994). "The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury." *J Biochem* 116: 1-6.

O'Donnell, C. (1997). "Hypertension and borderline isolated systolic hypertension increase risks of cardiovascular disease and mortality in male physicians. ." *Circulation* 95: 1132-1137.

Omar, B. G., NM Jordan, MC Striplin, SP Russell, WJ Downey, JM and McCord, JM. (1990). "Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. ." *Free Radic Biol Med* 9(465-471).

Packer, J. S., TF Willson, RL (1979). "Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C." Nature 278: 737-738.

Paglia, D. E. and W. N. Valentine (1967). "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase." J Lab Clin Med 70(1): 158-69.

Palmer, R. F., AJ Moncada, S (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature 327: 524-526.

Palozza, P. K., NI (1992). "Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview." Methods Enzymol 213: 403-420.

Pardo Merino, A. and M. A. Ruiz Díaz (2000). SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid.

Parks, D. G., DN (1986). "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology." Acta Physiol Scand Suppl 548(87-99).

Petrie JC, O. B. E., Littler WA, De Swiet M (1986). "British Hypertension Society. Recommendations on blood pressure measurement." Br. Med. J 293: 611-615.

Pigeolet, E. C., P Houbion, A Lambert, D Michiels, C Raes, M Zachary, MD Remacle, J (1990). "Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radical " Mech Ageing Dev 51: 283-297.

Pigeolet, R., J (1991). "Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals." Free Radic Biol Med 11: 191-195.

Porras, A. O., JC Palmer, G (1981). "The reaction of reduced xanthine oxidase with oxygen." J Biol Chem 256: 9096-9103.

prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." Circulation 101: 975-980.

Pryor, W. (1973). "Free radical reactions and their importance in biochemical system." Fed Proc 32: 1862-1869.

Pryor, W. S., GL (1995). "The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide." Am J Physiol 268: L699-L722.

Ramos, C. P., S Britigan, BE Cohen, MS and Rosen, GM. (1992). "Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes." J Biol Chem 267: 8307-8312.

Rasmussen, B. B., K (1996). "Determination of urinary metabolites of caffeine for the assessment of cytochrome P4501A2, xanthine oxidase and N-acetyltransferase activity in humans." Ther Drug Monit 18 (3): 254-262.

Ratyck, R. C., RS Bulkley, GB (1987). "The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells." Surgery 102: 122-131.

Reckelhoff, J. R., JC (2003). "Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension." Am J Physiol Integr Comp Physiol 284: R893-R912.

Redon, J. e. a. (2003). ""Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension."" Hypertension 41(5): 1096-1101.

Riesz, P. K., T (1992). "Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications." Free Radic Biol Med 13: 247-270.

Rinaldo, J. C., M Parinello, J Shepherd, VL (1994). "Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon- γ stimulated macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol 11: 625-630.

Rodríguez Perón, J. V. G., JR (2002). "Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial." *Rev Cubana Med Milit* 31(4).

Rodríguez, J. M., JR Trujillo, LY (2001). "Radicales libres en biomedicina y estrés oxidativo." *Rev Cubana Med Milit* 30(1): 36-44.

Ronan K.Brown, A. M., Joe Lunec and Frank J.Kelly (1995). "Oxidative damage to DNA in Patients with cystic fibrosis." *Free Radic Biol Med* 18(4): 801-806.

Rosen, G. P., S Ramos, CL Cohen, MS Britigan, BE (1995). "Free radical and phagocytic cells." *FASED J* 9: 200-209.

Rosenquist, T. Z., DO Grollman, AP (1997). "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase." *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7429-7434.

Rossi, F. (1986). "The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanism of activation and function." *Biochem Biophys Acta* 853: 65-89.

Rowe, G. M., HN Caplan, M Hess, ML (1983). "Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cicloxygenase pathway." *Circ Res* 53: 584-591.

Sáez-Tormo, G. e. a. (2004). "Factors related to the Impact of Antihypertensive Treatment in Antioxidant Activities and Oxidative Stress By-products in Human Hypertension." *Am J Hypertens* 17: 809-816.

Sáez, G. (2005). *Biopatología de los radicales libres*. Madrid, Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia.

Sáez, G. B., W Bannister, JV (1990). *Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity.* . Florida, CRC Press Inc.

Saini, H. A., AS Dhalla, NS (2004). "Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction." *Can J Cardiol* 20(3): 333-346.

Saitoh, T. S., K Yamaguchi, S Tani, M Seki, S Murakami, H Nojima, Y Yokota, J (2001). "Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein." *Mutat. Res.* 486: 31-40.

Salo, D. P., RE Lin, SW Giulivi, C Davies, KJ (1990). "Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation." *J Biol Chem* 265: 11919-11927.

Santini, S. A., G. Marra, et al. (1997). "Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM." *Diabetes* 46(11): 1853-8.

Santus, R. P., LK Filipe, P Morlière, P Hug, GL Fernandes, A Mazière, JC (2001). "Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions." *Free Radic Res* 35: 129-136.

Schüep, W. R., R (1994). "Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue:high performance liquid chromatography." *Methods Enzymol* 234: 294-302.

Segal, A. A., A (1993). "The biochemical basis of the NADPHoxidase of phagocytes." *TIBS* 18: 43-47.

Shepherd, P. K., BB (1999). "Glucose transporters and insulin action implications for insulin resistance and diabetes mellitus." *N Eng J Med* 341: 248-257.

Shigenaga, M. K. and B. N. Ames (1991). "Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage." Free Radic Biol Med 10(3-4): 211-6.

Shih, S. J., M Liu, N Smith, LE (2003). "Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity." J Clin Invest 112: 50-57.

Siems, W. G., T Esterbauer, H (1995). "4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine." Life Sci 57: 785-789.

Sies, H. (1985). Oxidative Stress. London.

Siggaard-Andersen, O. U., A Gothgen, IH (1995). "Classes of tissue hypoxia." Acta Anaesthesciol Scand 39: 137-142.

Slater, T. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." Biochem J 222: 1-15.

Sonnenberg, G. K., GR Kissebah, AH. (2004). "A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome." Obes Res 12: 180-186.

Southorn, F. P., G (1988). "Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions" Mayo Clin Proc 63: 381-389.

Stadtman, E. O., CN (1991). "Metal-catalyzed oxidation of protein. Physiological consequences." J Biol Chem 266: 2005-2008.

Stocker, R. G., AN Ames, BN (1987). "Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin." Proc Natl Acad Sci USA 84: 5918-5922.

Stralin, P. K., K Johansson, BO Marklund, SL (1995). "The interstitium of the human arterial wall contains very large amount of extracellular superoxide dismutase." Arterioscler Thromb Vasc Biol 15: 2032-2036.

Stroes, E. K., J Cosentino, F Erkelens, W Wever, R Koomans, H (1997). "Tetrahydrobiopterina restores endothelial function in hypercholesterolemia." J Clin Invest 99(41-46).

Stryer, L. (1995). Fosforilación oxidativa.

Stuehr, D. (1999). "Mammalian nitric oxide synthases." Biochem Biophys Acta 1411: 217-230.

Takao, M. A., H Kobayashi, K Yasui, A (1998). "Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage." Nucl.Acids Res 26: 2917-2922.

Tan, S. Y., Y Dickens, E Cash, TG Freeman, BA Parks, DA (1993). "Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock." Free Radic Biol Med 15: 407-414.

Tian, W. B., L Apse, K Pang, J Rose, M Tian, X Stantion, R (1999). "Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death." Am.Physiological Soeciety 0363: C1121-C1131.

Townsend, D. T., K Tapiero, H (2003). "The importance of glutathione in human disease." Biomedicine&Pharmacotherapy 57: 145-155.

Trujillo, M., M. N. Alvarez, et al. (1998). "Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols." J Biol Chem 273(14): 7828-34.

Tubaro, E. L., B Santiangeli, C Cavallo, G (1980). "Xanthine oxidase: an enzyme playing a role in the killing mechanism of polymorphonuclear leukocytes." Biochem Pharmacol 29: 3018-3020.

Turrens, J. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol 552: 335-344.

Umans, J. L., R (1995). "Nitric Oxide en the regulation of blood flow and arterial pressure." *Annu Rev Physiol* 57: 771-790.

Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." *Methods Enzymol* 252: 38-53.

Van, K. E. and W. G. Zijlstra (1961). "Standardization of hemoglobinometry. II. The hemiglobincyanide method." *Clin Chim Acta* 6: 538-44.

Varizi, N. N., M Ho, ND Boroujerdi-Rad, L Sindhu, RK (2003). "Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency." *Kidney Int* 63: 179-185.

Verma, S. A., TJ (2002). "Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist." *Circulation* 105: 546-549.

Vulliamy, T. M., P Luzzato,L (1992). "The moleculr basis of glucose-6-phosphate dehidrogenase deficiency." *Curr. Trends Genet* 8: 138-143.

Wannamethee, S. (2005). "Serum uric acid and risk of coronary heart disease." *Curr. Pharm Des* 11(32): 4125-4132.

Wang, W. B., N (1998). "Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions." *Pharmacol Rev* 50(3): 335-355.

Waud, W. R., KV (1976). "Purification and properties of the NAD+-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase." *Arch Biochem Biophys* 172: 354-364.

Waud, W. R., KV (1976). "The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD+-dependent (type D) to an O₂-dependent form (type O)." *Arch Biochem Biophys* 172: 365-379.

Weisiger, R. F., I (1973). "Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization." J Biol Chem 248: 4793-4796.

Weiss, S. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." N Eng J Med 320: 365-376.

Wolf, S. D., RT (1986). "Fragmentation of proteins by free radical and its effect on their susceptibility to enzymatic hydrolysis." Biochem J 234: 399-403.

Wolf, S. D., RT (1987). "Glucose oxidation and protein modification. The potential role of "autooxidative glycosilation" in diabetes." Biochem J 245: 243-250.

Wu, L. J., BH (2002). "Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertension rat vascular smooth muscle cells." Hypertension 39: 809-814.

Yamawaki, H. H., J Berk, BC (2003). "Thioredoxin: A Key Regulator of Cardiovascular Homeostasis." Circ Res 93: 1029-1033.

Yim, B. C., PB Stadtman, ER (1990). "Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide." Proc Natl Acad Sci USA 87: 5006-5010.

Yokoyama, Y. B., JS Beckman, TK Wheat, JK Cash, TG Freeman, BA Parks, DA (1990). "Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury." Am J Physiol 258: G564-G570.

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