

# Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares

## *Determination of oxidative stress markers in cardiovascular disease patients*

► Livan Delgado Roche<sup>1\*</sup>, Gregorio Martínez Sánchez<sup>2\*</sup>, Arquímedes Díaz Batista<sup>3\*\*</sup>

1. Lic. en Ciencias Farmacéuticas, Reserva Científica.
2. Dr. en Ciencias Farmacéuticas, Investigador Titular.
3. Dr. en Ciencias de la Salud.

\* Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Avenida 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

\*\* Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular. Calzada del Cerro No. 1551, Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba.

### Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar el estudio del ambiente redox en pacientes con enfermedades cardiovasculares, a través del análisis de una serie de marcadores de estrés oxidativo. Estos fueron determinados en suero de 113 pacientes y 60 sujetos sanos mediante técnicas espectrofotométricas. Todos los marcadores del balance de antioxidantes/pro-oxidantes se modificaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en estos pacientes con respecto al grupo control. Se observó un incremento en los marcadores de daño a biomoléculas y una disminución de la concentración de glutatión reducido. Por su parte las enzimas antioxidantes se activaron en estos pacientes con una disrupción del equilibrio catalasa/superóxido dismutasa. Por otra parte, el potencial de peroxidación se incrementó en un 73,02%, mientras que la capacidad reductora de hierro férrico en plasma disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en estos pacientes. El diseño experimental empleado permitió concluir que en ellos existen altos niveles de estrés oxidativo. Además, los marcadores evaluados podrían ser extrapolados a las determinaciones de laboratorio clínico, permitirían un análisis más integral de la fisiopatología de estas enfermedades y también podrían ser utilizados como indicadores de eficacia terapéutica.

**Palabras clave:** estrés oxidativo \* especies reactivas del oxígeno \* enfermedades cardiovasculares

### Summary

*The aim of this study was to investigate the status of an extensive array of redox indices in cardiovascular disease patients compared with healthy subjects. Blood samples from 113 patients and 60 healthy subjects were tested by spectrophotometric techniques. All measured biomarkers of antioxidants/pro-oxidant balance were significantly ( $p < 0.05$ ) modified in patients compared with normal subjects. An increase in biomolecule damage markers and a significant ( $p < 0.05$ ) reduction in the soluble antioxidant glutathione was observed. Antioxidant enzymes were activated in these patients with a disruption of the catalase/superoxide dismutase balance. In addition, the global indicator of susceptibility to lipid peroxidation was increased by 73.02% in patients compared to the control group and the indicator of total antioxidant capacity was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced. In these patients there are high levels of oxidative stress. The evaluated indicators could be extrapolated to routine clinical analysis and contribute to an integral overview of cardiovascular diseases physiopathology and could also be used as indices of treatment efficacy.*

**Key words:** oxidative stress \* reactive oxygen species \* cardiovascular diseases

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Acta Bioquím Clín Latinoam 2009; 43 (3): 307-13

## Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte en el mundo occidental (1). En Cuba, estas representaron el 36,08% de la mortalidad causada por las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) en el año 2004 (2). Existen evidencias que plantean la existencia de una relación entre las ECV y el estrés oxidativo (EO) (3) (4). El EO consiste en un desbalance a corto o largo plazo del equilibrio antioxidantes/pro-oxidantes, que provoca una disrupción de los mecanismos de señalización y control celular, a causa de favorecer los procesos de pro-oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes (5).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEm) constituye la fuente primaria de obtención de energía en las células cardíacas. A través de ésta se producen una serie de procesos de óxido-reducción y con ello se generan especies reactivas del oxígeno (ERO) (6). Además, las células que utilizan el oxígeno como fuente de obtención de energía pueden generar ERO a partir de la reducción enzimática de éste. Estas reacciones se producen por la actividad de enzimas como la NADH/NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa y la óxido nítrico sintasa, entre otras (7).

Las ERO son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, con la consecuente afectación en sus estructuras y funciones (8). Por otra parte, existen defensas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y el glutatión reducido (GSH), los cuales son indispensables para que existan concentraciones basales de ERO y con ello el corazón funcione adecuadamente. Sin embargo, bajas concentraciones de antioxidantes hacen al corazón más susceptible al daño oxidativo (4).

La aterosclerosis constituye una enfermedad vascular crónica y un factor de riesgo (FR) importante para las ECV. El EO juega un papel fundamental en cada una de las etapas de la aterogénesis. La disfunción endotelial, uno de los eventos primarios de la aterosclerosis, afecta el delicado equilibrio entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores (9). Una de las hipótesis de mayor aceptación a la hora de dar explicación al proceso aterosclerótico es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) causada por las ERO generadas por las células circulantes y de la pared vascular (10) (11). Las LDL oxidadas (LDL-ox) tiene propiedades quimiotácticas sobre monocitos circulantes e inducen su diferenciación en macrófagos residentes, además de ser citotóxicas para las células endoteliales y otras del sistema vascular (12). Las LDL-ox son reconocidas por un receptor de membrana diferente, conocido como receptor *scavenger* y que se localiza en macrófagos fundamentalmente. Este receptor no está regulado por el contenido de colesterol intracelular y contribuye a la formación de células espumosas, las cuales constituyen un marcador de las lesiones ateroscleróticas (13). A causa de la oxidación del colesterol se forman un serie de derivados tóxicos como son los oxisteroles, fundamentalmente el 7 $\beta$ -hidroxicolesterol y el 7-cetocolesterol (14) (15).

Los efectos de las ERO sobre la función cardiovascular dependen fundamentalmente de las concentraciones en que éstas son producidas. Durante la generación de un EO moderado y controlado se produce la activación de una serie de cascadas de señalización intracelular que compensan la producción de ERO, sin embargo una continua sobreproducción de estas es-

pecies provoca la instauración de estados patológicos como las ECV (16). No obstante, la producción de ERO no es el único aspecto importante en el mantenimiento de la homeostasis redox en el sistema cardiovascular. Existen dos compuestos con propiedades antioxidantes de vital importancia como el *glutathion* (GSH) y la tiorredoxina (Trx) (17). Estos elementos constituyen cofactores de enzimas antioxidantes detoxificadoras de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como la GPx y la tiorredoxina reductasa (TrxR) (18). El incremento en estos tioles intracelulares protege a las células de la muerte inducida por EO (19), mientras que su disminución conlleva a estados de enfermedad (20) (21).

El objetivo de este trabajo fue determinar una serie de marcadores redox que permitan la interpretación de mecanismos fisiopatológicos asociados al EO y que se vinculan a la patogénesis de las ECV. Además, permitir la implementación de estos marcadores a las prácticas del laboratorio clínico para contribuir al diagnóstico y seguimiento de dichas patologías, así como también ofrecer una visión de la eficacia terapéutica de las farmacoterapias empleadas.

## Materiales y Métodos

### SUJETOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

En el estudio fueron incluidos pacientes con diagnóstico de alguna ECV, mayores de 50 años, de ambos sexos y sin distinción de etnias (113 pacientes). Fueron excluidos aquellos que presentaran alguno de los siguientes criterios: estados sépticos severos, insuficiencia renal o hepática, embarazo, VIH/SIDA, cáncer, diabetes Mellitus (DM) u otra enfermedad crónica de forma concomitante a la patología cardiovascular, antecedentes de alcoholismo o abuso de drogas, tratamiento con algún fármaco en etapa experimental o la incapacidad de cooperar con los requerimientos del estudio.

Como grupo control fueron reclutados 60 sujetos aparentemente sanos de ambos sexos y edades relacionadas con los pacientes. El consentimiento informado de todos los participantes (pacientes y voluntarios aparentemente sanos) fue obtenido luego de la explicación verbal y escrita de los métodos, riesgos y beneficios contemplados en el estudio. El protocolo fue revisado y aprobado por los comités de ética para las investigaciones en humanos del Instituto de Farmacia y Alimentos y del Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular.

### OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Fueron obtenidos 10 mL de sangre por punción venosa luego de un período de ayuno de al menos 12 h. La sangre fue centrifugada sin anticoagulante a 3000 g 15 min a 4 °C y el sobrenadante (suero) fue separado en los volúmenes requeridos para cada determinación y almacenado a -70 °C hasta el momento del análisis.

### DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

#### Marcadores redox

En el estudio se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, la concentración de indicadores de daño a

biomoléculas como el malonildialdehído (MDA), hidroperóxidos totales (ROOH) y productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP). Fueron determinados también indicadores del estado antioxidante total como el potencial de peroxidación (PP) y la capacidad reductora de hierro férrico en plasma (FRAP), así como antioxidantes de bajo peso molecular como el GSH. Estos parámetros fueron determinados en suero mediante técnicas espectrofotométricas para lo cual fue utilizado un espectrofotómetro Ultrospect Plus (Pharmacia LKB).

#### *Actividad de superóxido dismutasa*

La actividad de SOD fue medida a través de la utilización del equipo diagnóstico Cat. No. SD125 proveniente de la firma Randox Ltd. (Diamond Road, Crumlin, Reino Unido). El fundamento del método se basa en la utilización de xantina y xantina oxidasa para generar anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual reacciona con el reactivo 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-cloruro de 5-feniltetrazolium (INT) y forma un complejo rojo detectable a 420 nm. La actividad de SOD fue medida a través de la inhibición de esta reacción (22).

#### *Actividad de catalasa*

La actividad de CAT fue medida siguiendo la descomposición de  $H_2O_2$  a 240 nm a intervalos de 10 s durante un minuto (23).

#### *Concentración de glutatión*

Luego de llevar a cabo una precipitación de grupos tioles proteicos, la concentración de GSH fue determinada mediante el método de Sedlak y Lindsay (24) que utiliza el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico)  $10^{-2}$  M (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). La longitud de onda utilizada fue de 412 nm. Fue utilizado GSH (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) como patrón de referencia para la generación de una curva de calibración que permitió la extrapolación y el cálculo de la concentración de GSH en la muestra analizada.

#### *Concentración de productos avanzados de la oxidación de proteínas*

La determinación de PAOP fue determinada a partir de una curva de calibración utilizando como patrón de referencia cloramina T (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). Fueron utilizados 100  $\mu$ L de suero en 1 mL de solución amortiguadora a los cuales fueron añadidos 50  $\mu$ L de yoduro de potasio (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) y 100  $\mu$ L de ácido acético glacial (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). La absorbancia de la reacción fue determinada inmediatamente a 340 nm contra blanco de reactivo (25). La concentración de PAOP fue expresada como  $\mu$ M de cloramina T.

#### *Concentración de malonildialdehído*

La concentración de MDA fue determinada a través de la utilización del equipo LPO-586 proveniente de Calbiochem (La Joya, CA, EE.UU.). En el ensayo se midió la producción de un cromóforo estable luego de la incubación de las muestras a 45 °C durante 40 min a una longitud de onda de 586 nm (26) (27). La generación de la curva de calibración fue a través

de la utilización de malonildialdehído bis [dimetil acetal] (Sigma St Louis, MO, EE.UU.).

#### *Concentración de hidroperóxidos totales*

Para la determinación de ROOH fue utilizado el equipo  $H_2O_2$  – 560 proveniente de Bioxytech (Oxis Internacional Inc., Portland, OR, EE.UU.). El ensayo se basa en la oxidación de iones ferrosos a férricos causada por los ROOH bajo condiciones ácidas. Los iones férricos se unen al indicador xilenol naranja (3,3'-bis(N,N-di(carboximetil)-aminometil)-o-cresol-sulfonaftaleina, sal sódica) (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) y forman un complejo estable coloreado detectable a 560 nm.

#### *Determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica*

Para su medición las muestras de suero fueron incubadas con una solución de sulfato de cobre 2 mM a 37 °C por un período de 24 h. Luego se cuantificó la concentración de MDA en la muestra y se le sustrajo a la concentración de MDA determinada a tiempo cero, o sea sin el proceso de incubación con sulfato de cobre (28).

#### *Determinación de la capacidad reductora de hierro férrico en plasma*

La determinación de agentes reductores en las muestras analizadas se llevó a cabo a través de la reducción del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  causada por la muestra y por una sustancia de referencia (ácido ascórbico) (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). El complejo  $Fe^{2+}$ -2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) fue detectado a 593 nm (29).

### *MEDICIÓN DE VARIABLES INTERVINIENTES*

#### *Determinación del índice de masa corporal*

El índice de masa corporal fue calculado según el siguiente criterio: se tomó el peso corporal (en kg) y se dividió por la altura (m) al cuadrado. Para ello se utilizaron instrumentos validados por el Comité Estatal de Normalización con el sello apto para su uso.

#### *Determinación de colesterol total*

La concentración de colesterol total fue medida enzimáticamente a través de la utilización de un equipo comercial proveniente de la firma Randox, Crumlin, RU.

### *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio de los datos para la detección de valores aberrantes (*outliers*). Posteriormente se llevó a cabo el análisis de homogeneidad de varianzas (Bartlett-Box) seguido de un ANOVA de clasificación simple. La comparación de medias entre los diferentes parámetros fue realizada a través de la utilización de la prueba t de Student de muestras no pareadas. Los datos experimentales fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). El nivel de significación estadística fue asumido como  $p < 0,05$ . El paquete estadístico utilizado para el procesamiento de los resultados fue el SPSS versión 12.0 en español.

## Resultados

En relación a las características de la población en estudio puede apreciarse en la Tabla I la distribución por sexo y grupos etarios, los cuales no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos grupos. La edad es un FR no modificable para las ECV. En el grupo de pacientes con ECV la mayor cantidad estuvo comprendida en el rango de 61 a 70 años (41,60%). Adicionalmente fueron detectados otros FR como la hipertensión arterial (HTA) con una prevalencia del 84,07%, hipercolesterolemia (46,02%), obesidad (45,13%) y tabaquismo (28,31%). Por su parte, el grupo de sujetos aparentemente sanos no presentaron FR asociados a las ECV.

Para llevar a cabo un análisis integral del comportamiento de los diferentes marcadores redox analizados fue tomada en cuenta la farmacoterapia de base de estos pacientes. Entre los medicamentos de mayor consumo se encontraron dinitrato de isosorbida (32,08%), clortalidona (29,20%), Atenolol (22,12%), Captopril (18,54%) y Aspirina® (83,18%).

Como se muestra en la Tabla II se produjo una modifica-

ción significativa ( $p < 0,05$ ) de todos los marcadores redox en los pacientes con respecto al grupo control. Se pudo constatar un aumento de la concentración de los marcadores de daño a biomoléculas (MDA, ROOH y PAOP), una disminución en las concentraciones de GSH y de agentes reductores presentes en el suero, un aumento en 73,02% de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica (POL), así como una activación de la actividad de las enzimas SOD y CAT con una disrupción del equilibrio entre ellas en los pacientes con ECV con respecto a los sujetos aparentemente sanos.

## Discusión

El EO ha sido asociado a la patogénesis de diversos trastornos cardiovasculares (30). Este vínculo se ha derivado de la hipótesis de modificación oxidativa de la aterosclerosis (10). En tanto, los FR cardiovascular han sido igualmente asociados al daño oxidativo y vistos como contribuyentes de las enfermedades del corazón. La HTA es el FR de mayor impacto

**Tabla I.** Caracterización de la muestra poblacional estudiada <sup>a</sup> La hipertensión fue definida con elevación de la presión sistólica ( $>140$  mmHg) y la diastólica ( $>90$  mmHg). <sup>b</sup> Hipercolesterolemia: incremento en la concentración de colesterol sérico  $>6,7$  mM/L. Las ECV fueron diagnosticadas según los antecedentes patológicos y el examen físico. <sup>c</sup> La obesidad se define como IMC  $>27$  kg/m<sup>2</sup>. CT: colesterol total.

Características	Grupo Control (n=60)		Pacientes (ECV) (n=113)		
	n	%	n	%	
Grupos etarios (años)	50-60	11	18	17	15,04
	61-70	23	38	47	41,60
	71-80	19	32	41	36,29
	> 80	7	12	8	7,07
Sexo	Femenino	35	58	71	62,83
	Masculino	25	42	42	37,17
Antecedentes patológicos	Hipertensión arterial <sup>a</sup>	-	-	95	81,07
	Infarto agudo del miocardio	-	-	9	7,96
	Insuficiencia cardíaca	-	-	23	20,35
	Cardiopatía isquémica	-	-	37	32,54
Factores de riesgo	Hipertensión arterial	-	-	95	84,07
	Hipercolesterolemia <sup>b</sup>	-	-	52	46,02
	Obesidad <sup>c</sup>	-	-	51	48,13
	Tabaquismo	-	-	32	28,31
Otros criterios	CT (mM/L)	3,18 ± 0,50		7,8 ± 1,1	
	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,1 ± 2,3		34,5 ± 9,6	

Nota: No existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre grupos con respecto a la edad y el género.

**Tabla II.** Marcadores de estrés oxidativo de la muestra poblacional. MDA: malonildialdehído, ROOH: hidroperóxidos totales, PAOP: productos avanzados de la oxidación de proteínas, GSH: glutatión reducido, CAT: catalasa, SOD: superóxido dismutasa, PP: potencial de peroxidación, FRAP: capacidad reductora de hierro férrico del plasma.

Marcadores de estrés oxidativo	Grupo control (n=60)	Pacientes (ECV) (n=113)
MDA (μM)	1.87 ± 0.27	12.41 ± 6.42
ROOH (μM)	103 ± 17	186 ± 21
PAOP (μM de Cloramina T)	12.13 ± 0.93	30.41 ± 9.9
GSH (mg/L)	786 - 1146	363 ± 168
CAT (U/L/min)	161.5 ± 12.5	915.1 ± 166.2
SOD (U/mL/min)	1.45 ± 0.15	31.04 ± 6.01
CAT/SOD	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.02
PP (μM)	7.32 ± 0.56	27.13 ± 8.35
FRAP (μM)	1017 ± 206	203 ± 84

sobre las ECV (31), en el presente estudio se pudo constatar su elevada prevalencia como un problema de salud en los pacientes estudiados.

La hipercolesterolemia es otro FR que contribuye a las complicaciones cardiovasculares. Las células de mamíferos han desarrollado diversos mecanismos para regular y controlar el apropiado contenido de colesterol, ya que su exceso provoca afectaciones al adecuado funcionamiento celular y puede comportarse como pro-aterogénico (13). Un aumento del colesterol sérico constituye un FR para la aterosclerosis, el infarto agudo del miocardio y la enfermedad isquémica del corazón (32).

La prevalencia de la obesidad en el mundo se incrementa rápidamente. El peso corporal es el resultado del balance entre el consumo de alimentos y el gasto energético (33). En los pacientes analizados, fueron detectados un número importante de obesos, tal y como fue reflejado en el índice de masa corporal (IMC). También es conocido que la obesidad es un FR asociado a patologías como la HTA, la DM y los síndromes coronarios. Solamente en los Estados Unidos se estima que 300.000 muertes cada año están asociadas a la obesidad (34).

El tabaquismo fue otro de los FR para las ECV detectados en la población de pacientes incluidos en el estudio. Este hábito tóxico está estrechamente relacionado a enfermedades pulmonares y cardiovasculares. En el humo del tabaco existe una gran concentración de radicales libres, entre ellos ERO, los cuales son responsables de los daños ocasionados por el tabaco a la salud (35).

Durante las pasadas décadas se han desarrollado un importante número de investigaciones encaminadas a conocer aspectos tales como la toxicidad del oxígeno y el papel que juegan las ERO en tan diversos estados fisiopatológicos<sup>36</sup>. En el presente estudio se aplicaron una serie de métodos y herramientas bioquímicas con el objetivo de conocer el estado redox de pacientes con ECV y con ello contribuir al conocimiento que se genera en torno a esta área de la investigación.

La POL es un proceso deletéreo que afecta los ensamblajes lipídicos y proteicos, como es el caso de las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas, y usualmente está asociado a un mal funcionamiento celular<sup>37</sup>. Durante el proceso de POL el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) puede atacar un átomo de hidrógeno metilénico de un AGPI y formar un radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ); como resultado queda un  $e^-$  sin aparear en el átomo de carbono metilénico. Este radical sufre un reordenamiento molecular que produce un dieno conjugado el cual reacciona con el oxígeno para dar lugar a un radical hidropéroxil lipídico ( $\text{LOO}\cdot$ ). Dicho radical extrae un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metileno del AGPI adyacente y forma otro  $\text{L}\cdot$  y el hidropéroxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) correspondiente y de esta forma se desencadenan reacciones radicalarias que terminan cuando dos RL reaccionan entre sí y se estabilizan (38).

Como parte de los productos tóxicos derivados de la POL se encuentra el MDA. En los pacientes con ECV se pudo constatar un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en las concentraciones plasmáticas de este indicador con respecto a los sujetos aparentemente sanos. Este comportamiento está en correspondencia con otros hallazgos donde se sugiere que este producto de la POL conlleva a la pérdida del equilibrio redox celular en las ECV (39) (40).

Con respecto a los marcadores que reflejan el proceso antes mencionado puede observarse en la Tabla II que existen concentraciones elevadas de ROOH en los pacientes con respecto al grupo control. Es conocido que los ROOH juegan un papel

fundamental en la citotoxicidad y la apoptosis inducida por varios estímulos (41). Evidencias experimentales sugieren que la generación endógena de peróxidos, tanto de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como peróxidos lipídicos, está relacionada en la patogénesis de la aterosclerosis mediante dos mecanismos, fundamentalmente. Primero, es conocido que los peróxidos son capaces de inducir modificaciones oxidativas en las lipoproteínas, especialmente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado en la vasculatura es capaz de oxidar la LDL en experimentos *in vitro* (42). La LDL-ox y sus componentes lipídicos inducen los procesos aterogénicos como es el caso del daño a las células vasculares, la interacción entre células del sistema inmune y el endotelio vascular, así como la inducción de la migración y proliferación de las células del músculo liso vascular (43). El segundo y muy relacionado con el primero es la capacidad de los peróxidos de incrementar la sensibilidad de las células vasculares a las LDL-ox (44).

Otra de las biomoléculas que pueden ser afectadas por las ERO son las proteínas, a través de su interacción directa con éstas o a través de la oxidación de lípidos y azúcares que luego son capaces de reaccionar con las proteínas y afectar su estructura y función (45). Como era de esperar, la concentración de PAOP fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los pacientes con ECV que en el grupo control. Una de las consecuencias del EO es la formación de proteínas oxidadas, tanto en el interior celular como en los fluidos extracelulares. Estas proteínas modificadas pueden experimentar la pérdida de sus funciones o en algunos casos adquirir propiedades no deseables (46). Los PAOP son el resultado del entrecruzamiento, agregación y fragmentación de las proteínas como consecuencia de su oxidación. Estos eventos generan cambios en la hidrofobicidad, conformación, alteración en la susceptibilidad a la acción de enzimas proteolíticas o formación de nuevos grupos reactivos como son los hidropéroxidos (47).

En relación al alto grado de daño a biomoléculas, en los pacientes estudiados se cuantificaron bajas concentraciones de GSH. Este resultado está en correspondencia con los hallazgos de Paim *et al* que sugieren que el metabolismo del GSH se encuentra alterado en estados de hipercolesterolemia (7); esta podría ser una de las causas que justificaría la disminución significativa de GSH en la ECV, además de estar relacionado con la detoxificación de metabolitos oxidados a expensas de su oxidación; luego, si existe una disrupción de su metabolismo, no debe haber una adecuada generación de éste por parte de la glutatión reductasa (GR), aunque no se puede ser categóricos en este planteamiento ya que no fue medida su actividad en este estudio. El papel fisiológico de este tiol intracelular es de vital importancia en el mantenimiento de la homeostasis redox (48).

La actividad de las enzimas antioxidantes también está condicionada por la generación de ERO; el aumento o disminución de éstas puede observarse en diferentes estados fisiopatológicos donde el EO es causa o consecuencia de estos. En la Tabla II se puede observar un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad de CAT y SOD en los pacientes con respecto a los sujetos controles. El incremento en la actividad de CAT puede estar condicionado por una inducción causada por las concentraciones de hidropéroxidos. En la literatura se provee información acerca del necesario estado de equilibrio que debe existir entre la actividad de ambas enzimas para que pueda llevarse a cabo un efectivo control del EO. La relación CAT/SOD ha sido considerada recientemente como un importante biomarcador redox (8). En el estudio se puede observar una disrupción en el estado de equilibrio de estas

enzimas, lo cual conlleva a la afectación de biomoléculas en las ECV, como pudo apreciarse anteriormente.

Por otra parte, dada la imposibilidad de medir todos los componentes del sistema redox se han desarrollado algunos métodos que permiten medir el estado redox global. El PP y FRAP séricos constituyen una expresión del balance entre la generación e inactivación de metabolitos oxidados (8). En la Tabla II se puede apreciar una elevada susceptibilidad a la POL y a los daños oxidativos en membranas celulares y fluidos extracelulares, dado el incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en el PP y la disminución de FRAP en los pacientes con ECV con respecto al grupo control.

## Conclusiones

Luego del análisis de los resultados y teniendo en cuenta el diseño experimental utilizado se puede concluir que en los pacientes analizados con ECV existe un EO asociado a estas patologías. El estudio ofrece evidencias experimentales adicionales que sugieren la existencia de un incremento del daño a biomoléculas, una disrupción de las enzimas antioxidantes y un aumento en la susceptibilidad a la POL en las ECV en cuestión. Estos resultados apuntan a las ERO como contribuyentes importantes del proceso patogénico de las diferentes ECV presentes en este estudio. También señalan la necesidad de implementar terapias antioxidantes individualizadas para contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes. Los marcadores bioquímicos utilizados pueden ser una herramienta clínica de gran utilidad para dar seguimiento a estas intervenciones farmacológicas y nutricionales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el apoyo ofrecido por el hospital "Salvador Allende" de Ciudad de La Habana y la asistencia técnica de Maite Casanova.

## CORRESPONDENCIA

LIC. LIVAN DELGADO ROCHE  
 Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas  
 Instituto de Farmacia y Alimentos  
 Universidad de La Habana  
 Calle 222 No. 21 425 e/ 214 y 222  
 La Coronela, La Lisa, CIUDAD DE LA HABANA, Cuba  
 E-mail: livan@cieb.sld.cu, ldelgado-roche@gmail.com

## Referencias bibliográficas

1. Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, Samali A. Don't lose heart – therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 609-22.
2. MINSAP. Anuario estadístico. Ministerio de Salud Pública. Ciudad de La Habana 2004. Disponible en: <http://www.sld.cu/servicios/estadisticas/>. [Fecha de Acceso: 1° de diciembre de 2006].
3. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25.
4. Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(6): 851-61.
5. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10): 1865-79.
6. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and *in vivo* monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108 (16): 1912-6.
7. Paim BA, Velho JA, Castilho RF, Oliveira HC, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor *knockout* mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med* 2008; 44 (3): 444-51.
8. Martínez-Sánchez G, Popov I, Pérez-Davison G, Al-Dalaen S-M, Horwat-Delaporte R, Giuliani A, *et al.* Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complications. *Acta Farm Bonaerense* 2005; 24 (2): 197-203.
9. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-95.
10. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.
11. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1815-26.
12. Libby P. Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am J Cardiol* 2006; 98 (12A): 3Q-9Q.
13. Gesquière L, Loreau N, Blache D. Role of the cyclic AMP-dependent pathway in free radical-induced cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29 (2): 181-90.
14. Larsson H, Böttiger Y, Iuliano L, Diczfalusy U. *In vivo* interconversion of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2007; 43 (5): 695-701.
15. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 142 (1): 1-28.
16. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35 (6): 615-21.
17. Watson WH, Chen Y, Jones DP. Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors* 2003; 17 (1-4): 307-14.
18. Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420 (2): 305-11.
19. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 2004; 577 (3): 427-33.
20. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288 (3): H1417-24.
21. Li X, Li S, Xu Z, Lou MF, Anding P, Liu D, *et al.* Redox control of K<sup>+</sup> channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40 (3): 339-49.
22. Randox Radicales Libres. Crumlin, UK: Randox Laboratories Ltd.; 1996. p. 1-16.
23. Boehringer M. Biochemical Information. Enzymes for routine. 1st ed., Berlin: Boehringer Mannheim; 1987: 15-6.
24. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25 (1): 192-205.
25. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, *et al.* Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161 (5): 2524-32.
26. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of *N*-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hy-

- droxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998; 11 (10): 1184-94.
27. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-21.
  28. Özdemirler G, Mehmetçik G, Öztezcan S, Toker G, Sivas A, Uysal M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Horm Metab Res* 1995; 27 (4): 194-6.
  29. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239 (1): 70-6.
  30. Chen K. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2003; 35 (2): 117-32.
  31. Lithell H. Pathogenesis and prevalence of atherosclerosis in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1994; 7 (7 Pt 2): 2S-6S.
  32. Wald NJ, Law MR. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1995; 118 Suppl: S1-5.
  33. Lee WJ, Koh EH, Won JC, Kim MS, Park JY, Lee KU. Obesity: the role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in body weight regulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37 (11): 2254-9.
  34. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (6): 2522-5.
  35. Panda K, Chattopadhyay R, Chattopadhyay D, Chatterjee IB. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C. *Toxicol Lett* 2001; 123 (1): 21-32.
  36. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18 (6): 655-73.
  37. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (2): 154-72.
  38. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2003; 34 (2): 145-69.
  39. Levraut J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker T. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284 (2): H549-58.
  40. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420 (2): 222-36.
  41. Camandola S, Poli G, Mattson MP. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J Neurochem* 2000; 74 (1): 159-68.
  42. Guo ZM, Van Remmen H, Yang H, Chen XL, Mele J, Vijg J, *et al.* Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1131-8.
  43. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11 (3-4): 93-102.
  44. Guo ZM, Ran Q, Roberts LJ II, Zhou L, Richardson A, Sharan C, *et al.* Suppression of atherogenesis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radic Biol Med* 2008; 44 (3): 343-52.
  45. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208.
  46. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305 (3): 709-18.
  47. Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic Biol Med* 2003; 34 (1): 44-55.
  48. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (5): 386-93.

Aceptado para su publicación el 30 de junio de 2009