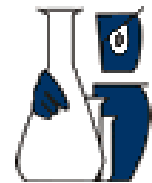




**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – ALIMENTOS

TESIS:

**EVALUACIÓN DE LAS ENZIMAS ASOCIADAS AL
SISTEMA GLUTATIÓN EN EL PROCESO ISQUÉMICO
CEREBRAL EN RATAS.**

Que presenta para obtener el título de Químico Farmacobiólogo

pQFB Norma Judith Cruz Ortega

Asesor:

Dra. Patricia Aguilar Alonso

Junio 2014



Puebla, Pue. a 25 de Noviembre de 2013

**C. CRUZ ORTEGA NORMA JUDITH
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Bioquímica y Alimentos,

DRA. PATRICIA AGUILAR ALONSO, Director de Tesis,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**EVALUACIÓN DE LAS ENZIMAS ASOCIADAS AL SISTEMA GLUTATIÓN EN EL
PROCESO ISQUÉMICO CEREBRAL EN RATAS**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA

DIRECTOR





M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
PRESENTE

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno
de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
CRUZ ORTEGA NORMA JUDITH

realizada en el area de Bioquímica y Alimentos, comunican a Ud. la aprobación
de la misma con la siguiente redacción:

**EVALUACIÓN DE LAS ENZIMAS ASOCIADAS AL SISTEMA GLUTATIÓN EN EL
PROCESO ISQUÉMICO CEREBRAL EN RATAS**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los
26 dias del mes de Mayo de 2014

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DC. LAURA MORALES LARA

DC. ADDI RHODE NAVARRO CRUZ

MC. ROSA MARÍA DAVILA MARQUEZ



C.c.p. Archivo



C.P. JOSÉ JUAN MORALES RODRÍGUEZ
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 26 de Mayo de 2014, signado por el Coordinador del Departamento de Bioquímica y Alimentos de la Facultad de Ciencias Quimicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

CRUZ ORTEGA NORMA JUDITH

JURADO

DC. LAURA MORALES LARA
DC. ADDI RHODE NAVARRO CRUZ
MC. ROSA MARIA DAVILA MARQUEZ

Examen que se realizará el dia 6 de Junio de 2014, a las 10:00 horas en Salón de Usos Múltiples.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 26 de Mayo de dos mil catorce

M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Resumen

La isquemia cerebral representa un problema de salud pública en la sociedad, siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial. Ante las condiciones extremas de estrés oxidativo se activan sistemas antioxidantes como el del glutatión, promoviendo la sobrevivencia celular, siendo sus enzimas asociadas las responsables del buen funcionamiento de este. En el presente trabajo se evaluó la actividad de Glutatión peroxidasa, Glutatión reductasa y Glutatión transferasa, así como el daño oxidativo reflejado en lipoperoxidación total y sus principales componentes: malonildialdehído y 4-Hidroxiálquenos, en un proceso isquémico cerebral en rata generado mediante el modelo de obliteración de la arteria carótida primitiva izquierda, en presencia y ausencia de un inhibidor de la producción de óxido nítrico. Analizando la actividad enzimática se observó que en la etapa temprana del proceso isquémico cerebral se genera glutatión oxidado que es reducido por la Glutatión reductasa y que no es eliminado de la célula por la Glutatión transferasa; a pesar de estos resultados se observa un incremento tanto de productos de lipoperoxidación total como de sus componentes. En la etapa tardía la Glutatión peroxidasa incrementa su actividad, la Glutatión reductasa la disminuye e inicia su recuperación la Glutatión transferasa, mientras que los productos de lipoperoxidación se elevan cada vez más con respecto del tiempo aunque estas enzimas se encuentren funcionando, siendo superados los niveles de malonildialdehído por 4-Hidroxiálquenos. En presencia del inhibidor de la producción de óxido nítrico se observa en general una disminución tanto de la actividad enzimática como en la concentración de los productos de lipoperoxidación en comparación con el grupo isquemia sin inhibidor. Se concluye que las enzimas asociadas al sistema glutatión modifican su actividad en respuesta a las necesidades celulares de detoxificación en cada etapa post-reperfusión de un proceso isquémico cerebral.

Abreviaturas más utilizadas

%	Porcentaje
±	Más/menos
°C	Grados Celsius
µL	Microlitros
4-HHE	4-hidroxi-(2E)-hexanal
4-HNE	4-hidroxinonenal
4-ONE	4-oxononenal
5-OPasa	5-oxoprolinasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AMPA	Ácido α – amino –3 - hidroxí – 5 metil – 4 – isoxazolepropiónico
Arg	Arginina
ASK1	Quinasa reguladora de señalización de apoptosis tipo 1
ATP	Adenosin trifosfato
BAD	Proteína asociada a Bcl-2 promotora de muerte celular
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
Ca ²⁺	Ión calcio
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CEOOH	Hidroperóxido de éster de colesterol
CH ₂ -	Grupos metileno
ChOOH	Hidroperóxido de colesterol
Cl ⁻	Ión cloruro
Cys	Cisteína
CysGly	Cisteinilglicina
Cα	Carbono alfa
DNCB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DTT	Ditiotreitol
EAAC1	Canales transportadores de aminoácidos excitatorios tipo C1
EAATs	Canales transportadores de aminoácidos excitatorios
EDTA acético	Ácido Etilendiamino tetra
eMCAO	Modelo embólico de oclusión de la arteria cerebral media
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
Fe ²⁺	Ión ferroso
g	Gramos
GCL	γ-glutamil cisteín ligasa
GCT	γ-glutamilciclotransferasa
Glu	Glutamato

Glu R2	Receptor para glutamato
Gly	Glicina
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GR _{ox}	Glutación reductasa oxidada
Grx	Enzima glutaredoxina
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
GSTA4	Glutación transferasa Alfa 4
GSTs	Glutación transferasas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO•	Radical hidroxilo
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JNK	Quinasas C-Jun N-terminal
K ⁺	Ión potasio
kDa	Kilo Daltones
KH ₂ PO ₄	Fosfato ácido de potasio
LDL	Lipoproteína de baja densidad
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
LOOH	Hidroperóxido de lípido
MAPEG	Proteínas de membrana asociadas a metabolismo de eicosanoides y glutación
MCAO	Obliteración de la arteria cerebral media
MDA	Malonildialdehído
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MSGT1	Glutación transferasa microsomal tipo 1
Na ⁺	Ión sodio
Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	Bomba sodio/potasio ATPasa
NaN ₃	Azida de sodio
NCBI	Centro Nacional para la información biotecnológica
NF-κβ	Factor nuclear kappa beta
-NH ₂	Grupos amino
nm	Nanómetros
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO•	Óxido nítrico
NOS	Sintasas del óxido nítrico

O ₂ ⁻	Superóxido
OACM	Oclusión de la arteria cerebral media
OACP	Obliteración de la arteria carótida primitiva
OMS	Organización mundial de la salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Buffer de fosfatos
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
pH	Potencial hidrógeno
PLOOH	Hidroperóxido de fosfolípido
PRX	Enzimas eroxiredoxinas
PUFA	Ácidos grasos insaturados y poliinsaturados
PUFA-OOH	Hidroperóxidos de lípidos
RaBP-1	Transportador tipo 1 de vinculación a proteínas
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROOH	Hidroperóxidos sintéticos pequeños
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
Sec	Selenocisteína
SecGPxs	Glutación peroxidasas con centro activo de selenio y cisteína
SeH	Selenol
SeOH	Ácido selénico
-SH	Tiol
SO ₃ H	Ácido sulfónico
SOD	Superóxido dismutasa
SOH	Ácido sulfénico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Trisma base
Trx	Enzima tioredoxina
Tyr	Tirosina
TyrGSSG	Residuo de Tyr al que se une el GSSG en la Glutación reductasa
TyrNADPH	Residuo de Tyr al que se une el NADPH en la Glutación reductasa
U	Unidades de actividad enzimática
U/mL	Unidades de actividad enzimática por Mililitro
X	Compuestos que pueden formar conjugaciones con GSH
γGluCys	γ-glutamil-cisteín
γGT	γ-glutamiltransferasa
ΔAbs/min	Delta de Absorbancia por minuto
μM	Micromolar

ÍNDICE

	Página
Resumen	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. HIPÓTESIS	2
4. OBJETIVOS	3
4.1 Objetivo general	3
4.2 Objetivos particulares	3
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
5.1 Isquemia cerebral	4
5.1.1 Incidencia de la isquemia cerebral	4
5.1.2 Síntomas de Isquemia cerebral	5
5.1.3 Factores de riesgo	6
5.1.4 Clasificación de la Isquemia cerebral	7
5.1.5 Modelos animales para el estudio de isquemia cerebral	8
5.1.6 Cascada de daño cerebral isquémico	11
5.2 Estrés oxidativo y sus efectos en el proceso isquémico cerebral	14

5.3	Lipoperoxidación	17
5.3.1	Malonildialdehído	18
5.3.2	4- Hidroxinonenal	19
5.4	Glutación	22
5.4.1	Síntesis de GSH	23
5.4.2	Funciones de Glutación	25
5.5	Glutación transferasa	27
5.5.1	Aspectos estructurales y clasificación de Glutación transferasa	27
5.5.2	Funciones de Glutación transferasa	29
5.5.3	Mecanismo de Glutación transferasa	30
5.6	Glutación reductasa	32
5.6.1	Aspectos estructurales y clasificación de Glutación reductasa	32
5.6.2	Funciones de Glutación reductasa	32
5.6.3	Mecanismo de Glutación reductasa	33
5.7	Glutación peroxidasa	34
5.7.1	Aspectos estructurales y clasificación de Glutación peroxidasa	34
5.7.2	Funciones de Glutación peroxidasa	36
5.7.3	Mecanismo de Glutación peroxidasa	38
5.8	L-NAME: inhibidor de la producción de óxido nítrico	40
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	42
6.1	Material, métodos, referencias y equipo	42
6.2	Diagrama de trabajo	43

7.	METODOLOGÍA	44
7.1	Biomodelo de estudio	44
7.2	Análisis bioquímicos	45
7.2.1	Determinación de actividad de Glutación transferasa	45
7.2.2	Determinación de actividad de Glutación reductasa	45
7.2.3	Determinación de actividad de Glutación peroxidasa	46
7.2.4	Determinación de productos de lipoperoxidación total (Malonildialdehído + 4-Hidroxiálquenos)	46
7.2.5	Malonildialdehído	47
7.2.6	4-Hidroxiálquenos	47
7.3	Análisis Estadístico	47
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
8.1	Actividad de Glutación transferasa	48
8.2	Actividad de Glutación reductasa	50
8.3	Actividad de Glutación peroxidasa	52
8.4	Lipoperoxidación total	55
8.5	Malonildialdehído	56
8.6	4-Hidroxiálquenos	58
8.7	Comparación entre la actividad de las diferentes enzimas responsables del metabolismo de Glutación y la lipoperoxidación total en el grupo Isquemia	60
9.	CONCLUSIONES	64
10.	SUGERENCIAS	65
11.	BIBLIOGRAFÍA	66
12.	ANEXOS	71

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Causas principales de defunciones en México en 2011	5
Figura 2. Zonas de daño cerebral isquémico	12
Figura 3. Estructura del receptor NMDA	13
Figura 4. Estrés oxidativo generado por ROS	16
Figura 5. Estructura química de 4-Hidroxinonenal y Malonildialdehído	18
Figura 6. Destinos celulares de los aldehídos α,β -insaturados	21
Figura 7. Estructura química de glutatión	23
Figura 8. Ciclo de síntesis, función y metabolismo de glutatión	24
Figura 9. Representación esquemática de la estructura de Glutatión transferasa citosólica	29
Figura 10. Modelos de conjugaciones y reducciones catalizadas por Glutatión transferasas	31
Figura 11. Representación esquemática de la estructura de Glutatión reductasa	33
Figura 12. Representación esquemática del mecanismo de actividad catalítica de Glutatión reductasa	35
Figura 13. Representación esquemática de los tetrámeros de Glutatión peroxidasa	36
Figura 14. Ciclo catalítico de Glutatión peroxidasa	40
Figura 15. Estructura química del L-NAME	41
Figura 16. Curva temporal de actividad catalítica de Glutatión transferasa durante un proceso isquémico cerebral en rata	49
Figura 17. Curva temporal de actividad catalítica de Glutatión reductasa durante un proceso isquémico cerebral en rata	57
Figura 18. Curva temporal de actividad catalítica de Glutatión peroxidasa durante un proceso isquémico cerebral en rata	53

Figura 19. Curva temporal de Lipoperoxidación total durante un proceso isquémico cerebral en rata	56
Figura 20. Curva temporal de Malonildialdehído (MDA) durante un proceso isquémico cerebral en rata	57
Figura 21. Curva temporal de 4-Hidroxiálquenos durante un proceso isquémico cerebral en rata	59
Figura 22. Curva temporal de actividad catalítica de las enzimas asociadas al sistema glutatión y lipoperoxidación total durante un proceso isquémico cerebral en rata	61

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Factores asociados al riesgo de sufrir isquemia cerebral	7
Tabla 2. Clasificación clásica de la isquemia cerebral	7
Tabla 3. Sistemas de clasificación de la isquemia cerebral	8
Tabla 4. Modelos animales para el estudio de la isquemia cerebral	9
Tabla 5. Principales funciones de glutatión	26
Tabla 6. Funciones de Glutatión transferasa	30
Tabla 7. Características estructurales y sustratos de Glutatión peroxidasas de mamíferos	37
Tabla 8. Métodos y referencias	42
Tabla 9. Equipo	42

1. INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral ocupa la segunda causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2014). Esta patología sucede cuando se interrumpe el suministro sanguíneo y por consiguiente de oxígeno y nutrientes al cerebro, provocando una serie de eventos que conducen al deterioro y muerte celular, trayendo implicaciones clínicas importantes.

Uno de los mecanismos que tiene un papel preponderante en el daño cerebral después de un evento isquémico es la producción de radicales libres que conducen al estrés oxidativo; pudiendo ocasionar desnaturalización de proteínas por nitración, nitrosilación, carbonilación, carreorexis, así como oxidación de los lípidos siendo el malonildialdehído y los 4-Hidroxi-alquenos los principales productos derivados de las reacciones de lipoperoxidación (Arai y col, 2011; Grimsrud y col, 2008).

Para contribuir a la sobrevivencia celular se activan sistemas antioxidantes endógenos encargados de la detoxificación de las especies oxidantes altamente reactivas, siendo el sistema Glutación y las enzimas asociadas a él, uno de los principales sistemas antioxidantes que responden ante las condiciones extremas de estrés oxidativo como las generadas en el proceso isquémico cerebral (Aoyama y Nakaki, 2013). Este sistema permite, la detoxificación celular, utilizando tres enzimas que participan directamente la transformación del glutación de reducido a oxidado generando un ciclo, estas enzimas son: Glutación peroxidasa (GPx), que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros hidroperóxidos orgánicos a agua o los correspondientes alcoholes usando glutación como reductor (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013); Glutación reductasa (GR) que cataliza la conversión de glutación oxidado (GSSG) en dos moléculas de glutación reducido (GSH) para ser vuelto a utilizar como antioxidante (Berkholz y col, 2008); y Glutación transferasa (GST) que cataliza un amplio rango de reacciones que involucran la adición de glutación a otro compuesto tóxico para posteriormente ser expulsado de la célula (Atkinson y Babbitt, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

El proceso isquémico cerebral es una de las afecciones neuronales con mayor incidencia en el mundo. Durante este proceso se activa el sistema antioxidante endógeno glutatión en respuesta al estrés oxidativo generado por la exacerbada producción de radicales libres. En trabajos previos en el laboratorio se ha estudiado el comportamiento de glutatión en diferentes etapas post-reperfusión del proceso isquémico; encontrándose que en las primeras dos horas post-reperfusión se incrementa la concentración de glutatión total y glutatión reducido correspondiente con el aumento del estrés oxidativo generado por la producción de óxido nítrico, y que en la etapa tardía del proceso los niveles de glutatión total y glutatión reducido disminuyen a niveles basales, mientras que la concentración de glutatión oxidado aumenta progresivamente (Guzmán-López, 2011). Sin embargo, el aumento de la concentración de glutatión oxidado es mucho menor con respecto a la disminución de glutatión total y glutatión reducido, siendo la interrogante saber qué pasa con el resto del glutatión total que disminuyó durante el proceso (Guzmán-López, 2011). Por este motivo es necesario evaluar a las enzimas asociadas al sistema glutatión a través de los cambios en su actividad, entre las que se encuentran: Glutatión reductasa, Glutatión peroxidasa y Glutatión transferasa; y evaluar al mismo tiempo productos de la lipoperoxidación consecuencia del estrés oxidativo generado en el proceso isquémico, como son malonildialdehído y 4-Hidroxiálquenos.

3. HIPÓTESIS

En respuesta al estrés oxidativo generado durante el proceso isquémico cerebral en rata se activa el sistema antioxidante endógeno glutatión variando la actividad de las enzimas asociadas al mismo en cada etapa post-reperfusión de acuerdo a las necesidades de detoxificación celular; pudiendo ser mediada esta actividad por óxido nítrico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar mediante técnicas espectrofotométricas a las enzimas asociadas al sistema antioxidante endógeno glutatión, a través de la determinación de las variaciones en su actividad enzimática durante un proceso isquémico cerebral en rata.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Evaluar la actividad de Glutatión transferasa, Glutatión reductasa y Glutatión peroxidasa durante el proceso isquémico cerebral en rata, en ausencia y presencia de un inhibidor de la producción de NO•.
- ✓ Determinar la proporción de los productos de lipoperoxidación total y sus componentes principales durante el proceso isquémico cerebral en rata, en ausencia y presencia de un inhibidor de la producción de NO•.
- ✓ Relacionar los cambios de la actividad de las enzimas asociadas al sistema glutatión con la lipoperoxidación generada en el proceso isquémico cerebral.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es producida por la interrupción del suministro sanguíneo al cerebro, usualmente causada por la ruptura o bloqueo de un vaso (OMS, 2014). Esta falta de oxígeno y nutrientes causa daño en el tejido cerebral provocando una serie de procesos nocivos que finalmente concluyen en la muerte neuronal en dos tipos diferentes: la primera por necrosis y la segunda por apoptosis (OMS, 2014; Arango-Davila y col, 2004).

5.1.1 Incidencia de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral es la segunda causa de muerte en el mundo. En el último reporte sobre esta enfermedad emitido por la OMS (2005) se estima que ocurren aproximadamente 5.7 millones de muertes a nivel mundial equivalente a 9.9 % de todas las muertes. De este grupo más del 85 % se presentó en personas que vivían en países de medianos y bajos recursos, y una tercera lo conforman personas menores de 70 años (OMS,2014).

En América la OMS reportó 460, 987 muertes por isquemia cerebral en 2004, cifra que representa el 8.8 % del total de muertes en mujeres y el 6.4 % del total de muertes en hombres en este continente (OMS, 2014).

En México, la isquemia cerebral se encuentra catalogada entre los accidentes cerebrovasculares que ocupan la cuarta causa de muerte, representando el 5.8 % del total de las defunciones en ambos sexos en el 2011, teniendo una mayor incidencia en mujeres con un 7.1 % que en hombres en los cuales representa el 4.6 %. (Figura 1) (INEGI, 2013).

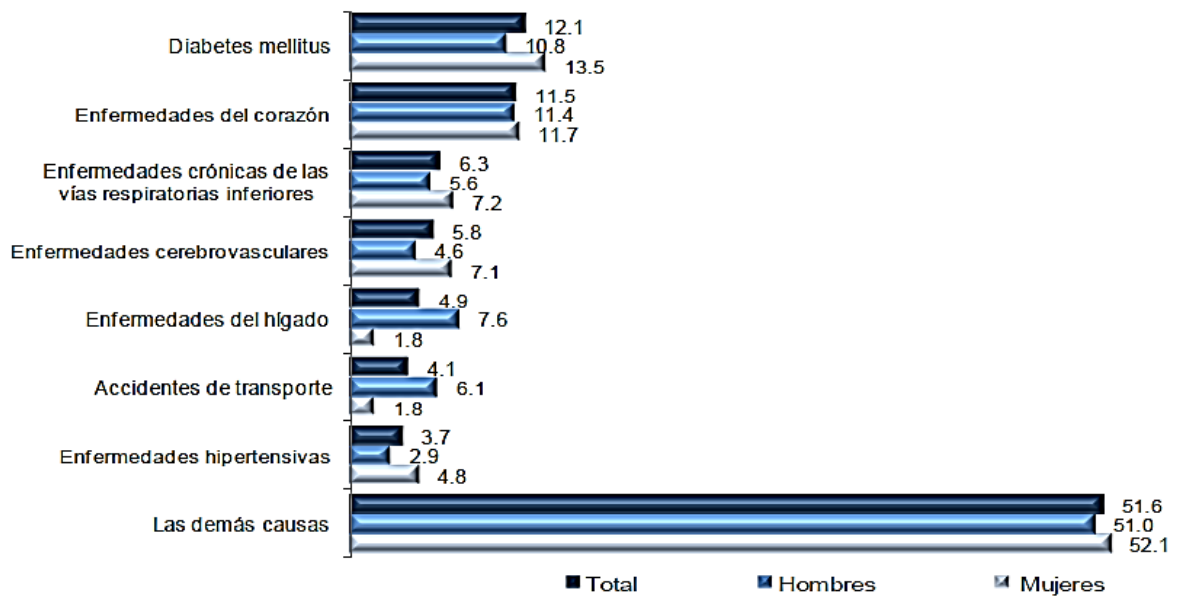


Figura 1. Causas principales de defunciones en México en 2011. Las enfermedades cerebrovasculares representan la cuarta causa de muerte en México, presentando mayor incidencia en mujeres que en hombres. Tomado de INEGI,2014.

5.1.2 Síntomas de Isquemia cerebral

El síntoma más común de la isquemia cerebral es debilidad o entorpecimiento repentino de la cara, brazos o piernas. Otros síntomas incluyen confusión, dificultad para hablar o comprender oraciones, dificultad para ver con uno o ambos ojos, dificultad para caminar, pérdida del equilibrio o coordinación, fuertes dolores de cabeza sin causa aparente, desmayo o pérdida de la conciencia, vértigo, pérdida de sensibilidad, nistagmos (movimientos involuntarios de los ojos), anopía (ceguera temporal), ataxia (incoordinación motora), disfagia (dificultad para tragar), disartria (descontrol de los músculos de la boca), oftalmoplejía (incapacidad para mover voluntariamente el globo ocular), hemiparesis (parálisis de un solo lado del cuerpo), amnesia, abulia (falta de energía), alexia (pérdida de la capacidad de leer) incontinencia urinaria, o incluso coma, dependiendo del territorio que irrigue la arteria involucrada (OMS, 2014; Aggarwal y col, 2010).

La severidad del daño producido también depende del tiempo que permanece interrumpida la irrigación e incluso puede causar la muerte (OMS, 2014); por lo tanto, el reconocimiento temprano de síntomas o características asociadas a un evento isquémico cerebral es crucial para salvaguardar la vida y condiciones de sobrevivencia del paciente (Álvarez-Sabín y col, 2011), por este motivo se han desarrollado métodos basados en preguntas sencillas que se realizan a la persona y que son de gran utilidad para un diagnóstico rápido y oportuno. Una de estas pruebas es la denominada “habla-brazo-cara”, en la que se evalúa la capacidad del paciente para sonreír o mostrar los dientes, levantar ambos brazos a 90° si está sentado (o 45° si se encuentra en posición supina), así como la habilidad para mantener una conversación. Si el paciente muestra dificultad para realizar estas actividades entonces se considera como un indicio de que puede estar sufriendo un evento isquémico cerebral y requiere atención médica de inmediato (Robinson y col, 2013).

5.1.3 Factores de riesgo

Son muchos los factores que desempeñan un papel importante en el desarrollo de la isquemia cerebral, entre ellos, la activación persistente del sistema inmune tiene un papel preponderante. Numerosas investigaciones basadas en estudios poblacionales demuestran la correlación entre los niveles de biomarcadores inmunológicos tales como el recuento de leucocitos en sangre, fibrinógeno, dímero- D y proteína C Reactiva, con el riesgo de isquemia cerebral incidental o recurrente; así mismo, la presencia de otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide también han sido relacionadas con este padecimiento cerebral (Vangilder y col, 2013; Kamel y Ladecola, 2012).

Otros factores predisponentes a sufrir isquemia cerebral se encuentran asociados a diversas condiciones de la persona, los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Factores asociados al riesgo de sufrir isquemia cerebral

Condición	Factor de riesgo
Hábitos personales	Consumo de drogas, abuso de alcohol, tabaquismo
Edad y condición genética	Raza, menopausia, edad avanzada
Desregulaciones en la presión arterial	Cardiopatías, preclampsia, hipertensión
Hemodinamia	Hemoconcentración, malformaciones vasculares, amiloidosis cerebral, coagulopatías
Metabolismo	Hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes

5.1.4 Clasificación de la Isquemia cerebral

La clasificación de la isquemia cerebral es crítica tanto en la práctica clínica como en la investigación básica. Un análisis preciso de sus subtipos requiere la integración de características clínicas encontradas en los test diagnósticos y el conocimiento de los factores etiológicos potenciales.

Por su mecanismo, la isquemia cerebral clásicamente se ha clasificado en dos tipos importantes: oclusiva y hemorrágica (Doyle y col, 2008), mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación clásica de la isquemia cerebral

Isquemia cerebral		
Oclusiva	Hemorrágica	
La Interrupción del suministro sanguíneo es resultado de la formación de un embolo o trombo que ocluye la arteria	Se interrumpe el suministro sanguíneo por ruptura de una arteria.	
<table border="1"> <tr> <td>Trombótica: El coágulo de sangre se forma dentro de la misma arteria que ocluye.</td> <td>Embólica: El flujo sanguíneo arrastra un coágulo formado en algún otro sitio hasta taponar una arteria.</td> </tr> </table>		Trombótica: El coágulo de sangre se forma dentro de la misma arteria que ocluye.
Trombótica: El coágulo de sangre se forma dentro de la misma arteria que ocluye.	Embólica: El flujo sanguíneo arrastra un coágulo formado en algún otro sitio hasta taponar una arteria.	

La isquemia oclusiva es más prevalente que la forma hemorrágica, presentándose aproximadamente en 87 % de los casos y es el blanco terapéutico de muchos tratamientos clínicos. La trombosis, embolismo o la hipoperfusión sistémica, todos ellos pueden causar un evento vascular cerebral, resultando en suministro insuficiente de oxígeno y glucosa necesario para mantener la homeostasis celular (Doyle y col, 2008).

Gracias a los avances en la tecnología diagnóstica se han desarrollado diferentes sistemas de clasificación para la isquemia cerebral, como el sistema de clasificación TOAST, el sistema de clasificación causativa (CCS) y el sistema de subclasificación chino (CISS) (Chen y col, 2012), cuyos subtipos principales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Sistemas de clasificación de la isquemia cerebral.

Sistema de clasificación	TOAST	Clasificación causativa (CCS)	Subclasificación china
Principales subtipos	Oclusión de arteria grande Cardioembolismo Oclusión de vasos pequeños Otra etiología determinada Etiología no determinada	Aterosclerosis de arteria supra-aórtica Embolismo cardioaórtico Oclusión de arteria pequeña Otras causas Causa indeterminada	Aterosclerosis de arteria grande Isquemia cardiogénica Enfermedad de arteria penetrante Otras etiologías Etiología indeterminada

5.1.5 Modelos animales para el estudio de isquemia cerebral

Se han desarrollado diferentes modelos en animales con el fin estudiar el proceso isquémico cerebral, cada uno con diferentes características. La finalidad es que los resultados sean lo más cercanamente posibles a lo que sucede en un humano de tal manera que se puedan extrapolar en un momento dado a la práctica clínica en el

desarrollo de estrategias neuroprotectoras y terapéuticas para ayudar a la prevención y a la recuperación de pacientes que han sufrido procesos isquémicos cerebrales. La complejidad para desarrollar el modelo depende de la información a obtener. El grado de lesión es dependiente del tipo, el tiempo y el modelo utilizado, siendo los más comunes en roedores, perros, gatos, gerbillos entre otros (Kristian y Hu, 2013; Lipton, 1999).

Los modelos están divididos en dos categorías (Tabla 4), isquemia global e isquemia focal (Kristian y Hu, 2013; Lipton, 1999; Pulsinelli y Brierley, 1979).

Tabla 4. Modelos animales para el estudio de la isquemia cerebral

Isquemia cerebral	
Isquemia Global	Isquemia Focal
<ul style="list-style-type: none"> • Oclusión de 4 vasos • Oclusión de 2 vasos • Oclusión de 2 vasos combinada con hipotensión 	<ul style="list-style-type: none"> • Obliteración de la arteria cerebral media (MCAO) • Modelo embólico de obliteración de la arteria cerebral media eMCAO

El modelo de oclusión de 4 vasos es un modelo de isquemia global que fue desarrollado en 1979 por Pulsinelli y Brierley, es un modelo de isquemia reversible en roedores. Entre las ventajas que presenta: es de fácil preparación, el daño neuronal causado es altamente predecible, se realiza en ausencia de anestesia, además de la baja incidencia de convulsiones (8 al 40%). Este modelo ha sufrido modificaciones, la más notable es la realizada por Alps y Hass (1987) quienes llevaron a cabo los dos procedimientos bajo anestesia, con el propósito de que esta contribuyera a disminuir la presión de la arteria carótida cuando el flujo de sangre al cerebro es seriamente reducido (Kristian y Hu, 2013; Pulsinelli y Brierley, 1979).

A mediados de los 80's, el modelo de oclusión de cuatro vasos fue gradualmente reemplazado por el modelo de isquemia cerebral de oclusión de dos vasos, el cual

presenta ciertas ventajas, siendo la principal que con este modelo se produce una isquemia global en donde tanto el inicio de la oclusión como la reperfusión ocurren de manera rápida, además de que el daño generado en este modelo permite observar el cambio de las condiciones celulares en numerosas áreas cerebrales, incluyendo la región CA1 del hipocampo, cuerpo estriado y corteza cerebral. Smith y colaboradores en 1984 implementaron una variante del modelo de oclusión de dos vasos en la que el procedimiento se hace bajo anestesia y aplicando un relajante muscular como suxametonio, requiriendo intubación endotraqueal y posterior ventilación mecánica. Este modelo se aplica principalmente a pequeños roedores como ratones y gerbillos. Se han hecho modificaciones a este modelo, una de las más significativas consiste en la administración de un relajante muscular sin la necesidad de intubación endotraqueal ni ventilación mecánica, utilizando halotano como anestesia, el cual produce una disminución de la presión sanguínea que se regula controlando la dosis de anestésico (Kristian y Hu, 2013; Lipton, 1999).

En cuanto a isquemia focal, el modelo ampliamente aceptado es el realizado mediante la Obliteración de la Arteria Cerebral Media (MCAO) en diferentes mamíferos (Krueger y col, 2013), junto con su variante embólica (eMCAO) en la cual la obliteración de dicha arteria se lleva a cabo mediante la formación de un coágulo extracerebral y su posterior introducción hasta el inicio de esta arteria (Canazza y col, 2014).

La diferencia entre los diversos modelos de daño tiene que ver con el tipo y el tiempo de lesión, en el modelo de isquemia focal el flujo sanguíneo es siempre más alto que durante una isquemia global, por lo que es requerido un mayor tiempo para generar daño, debido a su duración y la heterogeneidad el daño es mucho más complejo en este modelo que en la isquemia global, pero es un modelo invaluable, otra ventaja del modelo de Isquemia Cerebral focal es que permite estudiar el proceso isquémico cerebral sin dañar el cráneo o la columna vertebral ni generar cambios en la dinámica del líquido cefalorraquídeo o en los nervios cercanos a la arteria cerebral media. Es decir, permite estudiar el proceso en el cerebro, en el interior del cráneo

sin necesidad de manipularlo directamente, debido a que la intervención se hace desde afuera; asemejando en gran medida a lo que sucede en una persona afectada por un accidente cerebrovascular a causa de un proceso isquémico (Lipton,1999). Todos estos modelos han sido motivo de estudio de la patofisiología del proceso isquémico y permiten el desarrollo de estrategias neuroprotectoras.

5.1.6 Cascada de daño cerebral isquémico

Los mecanismos de daño cerebral involucran una compleja serie de eventos fisiopatológicos conocidos comúnmente como “cascada isquémica”, que dependen de la severidad, duración, y localización de la isquemia en el cerebro encontrándose fenómenos como falla energética, excitotoxicidad, estrés oxidativo, inflamación, y apoptosis. Todo esto resulta en severo daño a la unidad neurovascular, incluyendo tanto a neuronas, como glía y endotelio vascular (Arai y col, 2011).

En la lesión isquémica se pueden observar dos zonas importantes de daño en donde ocurre muerte celular de dos tipos necrótica y apoptótica; el centro de la isquemia o core (Figura 2), donde la muerte necrótica ocurre dentro de los primeros minutos; mientras que en la penumbra, la muerte ocurre lentamente mediante la activación de mecanismos que conducen a la apoptosis (Doyle y col, 2008).

En el core isquémico, el tejido cerebral es privado de nutrientes y oxígeno, generando condiciones de anaerobiosis de manera que los productos ácidos empiezan a acumularse, siendo el ácido láctico producto de la glucólisis anaeróbica el principal responsable de acidez en el medio. Las condiciones generadas llevan a la interrupción de la actividad de la cadena transportadora de electrones dentro de la mitocondria resultando en una rápida disminución de la concentración de ATP, provocando falta de la energía necesaria para llevar a cabo las funciones celulares normales. Debido a la pérdida de ATP, se genera una disfuncionalidad en los sistemas de bombas iónicas dependientes del mismo, como la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, resultando en un incremento de la concentración intracelular de

iones como Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- y un eflujo de K^+ , se ha estimado esta bomba consume alrededor del 70 % de la energía consumida por el cerebro (Doyle y col, 2008). Esta bomba iónica mantiene las concentraciones de iones en la proporción adecuada para la propagación de los potenciales de acción; la desregulación de su actividad causada por el proceso isquémico produce una redistribución de iones al interior y exterior de las neuronas conduciendo a una despolarización neuronal que lleva a un exceso de liberación de neurotransmisores, siendo el neurotransmisor excitatorio glutamato el principal responsable de excitotoxicidad (Albrecht y col, 2010; Doyle y col, 2008).

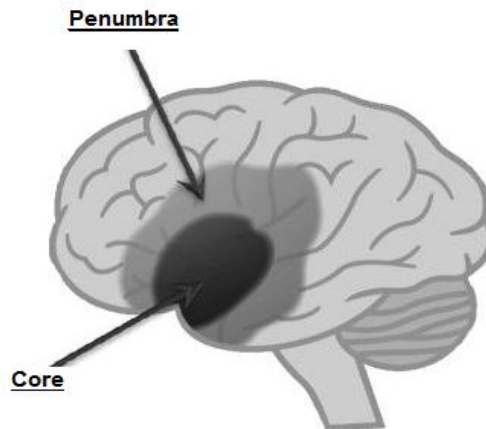


Figura 2. Zonas de daño cerebral isquémico. En la isquemia cerebral se presentan dos zonas de daño: el core donde se presenta directamente la interrupción del suministro sanguíneo y por lo tanto es la más dañada, y la zona de penumbra que se encuentra en la periferia. Tomado de Arai y col, 2011.

La despolarización de la membrana y la acumulación de sodio dentro de las células durante la isquemia causa una desregulación y reversión de los transportadores de glutamato seguido de una salida descontrolada del mismo en función de su gradiente de concentración (Doyle y col, 2008).

El efecto del aumento de concentración sináptica de glutamato es la activación directa de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido α - amino -3 - hidroxil - 5 metil - 4 - isoxazolepropiónico (AMPA) y la activación indirecta de los mismos por medio de la señalización causada por los receptores metabotrópicos de

glutamato. Los receptores NMDA (Figura 3) son permeables al calcio y la apertura descontrolada de estos canales lleva a un gran influjo de calcio provocando una sobrecarga del mismo (Doyle y col, 2008). Los receptores AMPA no son normalmente permeables al calcio sin embargo, después de una isquemia la subunidad Glu R2 de estos receptores se reduce, aumentando su permeabilidad a este metal (Liu y col. 2006).

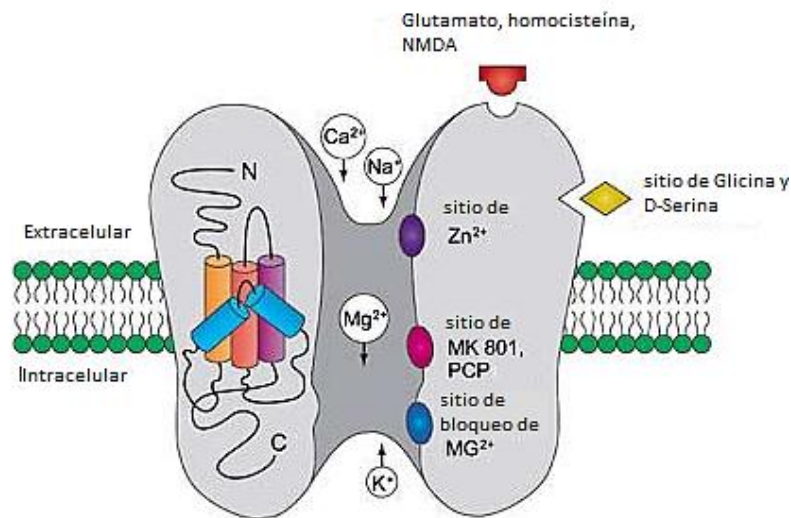


Figura 3. Estructura del receptor NMDA. El receptor NMDA tiene un sitio de unión a glutamato, por lo que es activado directamente en la isquemia cerebral por su acumulación, permitiendo un exacerbado influjo de calcio. Tomado de Smith, 2002.

El incremento de Ca^{2+} intracelular genera la activación de sistemas enzimáticos de proteasas que al ser activadas descontroladamente degradan proteínas funcionales para la célula así como compuestos estructurales incluyendo proteínas del citoesqueleto (Arai y col, 2011), y sintasas como la sintasa de óxido nítrico neuronal (comúnmente conocida como nNOS) dependiente de Ca^{2+} , lo que conlleva a un incremento en la producción de óxido nítrico (NO^\bullet) que al reaccionar con superóxido da lugar a la formación del anión peroxinitrito (ONOO^-) que contribuye al estrés oxidativo y a la excitotoxicidad mediada por este compuesto y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS), provocando nitración de

proteínas, lipoperoxidación y carriorexis, entre otros efectos nocivos para la célula (Arai y col,2011; Forman y col, 2008).

La cascada de daño cerebral isquémico comprende también la regulación positiva de una gran variedad de sistemas enzimáticos entre los que se incluyen a lipasas, proteasas, fosfatasas, cinasas y endonucleasas que son activadas por moléculas inflamatorias como citosinas, interleucinas y factores de transcripción, donde destacan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$), resultando en neuroinflamación (Chen y col, 2013). Así mismo, el desequilibrio en la concentración de iones resulta ser un quimioattractor de mediadores inflamatorios como leucocitos y moléculas de adhesión, causando acumulación de fluido lo que resulta en daño neuronal y formación de edema; adicionalmente, la barrera hematoencefálica pierde su selectividad y permeabilidad, trayendo consigo implicaciones clínicas importantes (Krueger y col, 2013).

En el proceso isquémico cerebral se ha estudiado ampliamente además de la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria otros procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular cerebral por apoptosis en la zona de penumbra, tales como la activación de caspasas 9, 8, 3, proteína asociada a Bcl-2 promotora de muerte celular (BAD), proteína X asociada a Bcl-2 (BAX), calpaínas y el estrés oxidativo con sus diferentes efectos nocivos (Lubos y col, 2011).

5.2 Estrés oxidativo y sus efectos en el proceso isquémico cerebral

En condiciones fisiológicas normales los requerimientos de oxígeno en el cerebro humano corresponden al 20 % del total consumido en todo el cuerpo, siendo que el cerebro representa solo el 2 % del peso corporal total, por lo tanto, el cerebro es uno de los órganos con mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) producto del metabolismo basal (Jhonson y col, 2012). Las ROS se forman como resultado del proceso metabólico en un organismo aeróbico saludable, la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RSN) es balanceada por los sistemas de

defensa antioxidantes. Sin embargo cuando se presenta un desbalance, algunas de estas especies median el daño que ocurre continuamente a moléculas que tienen que ser reparadas o reemplazadas. El término estrés oxidativo es primordialmente usado en la literatura de los radicales libres pero es raramente definido. En esencia, se refiere a una situación de desequilibrio entre la reducción de las ROS/NOS y de la defensa antioxidante promoviendo la oxidación de moléculas como NADPH por la NADPH oxidasa, y la oxidación de la xantina por la xantina oxidasa, entre otros eventos producidos durante la cadena transportadora de electrones (Grimsrud y col, 2008).

Aproximadamente del 2–4 % del oxígeno consumido por la mitocondria en el metabolismo normal es convertido en superóxido. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que subsecuentemente es convertido en agua y oxígeno molecular por la Glutación peroxidasa (GPx) o la catalasa (Figura 4) (Jhonson y col, 2012). El peróxido de hidrógeno tiene un tiempo de vida medio más largo que el superóxido, y a diferencia del superóxido, el peróxido de hidrógeno puede pasar a través de las membranas lipídicas por difusión o ser transportado a través de canales como las acuaporinas (Bienert y col, 2007).

El exceso de peróxido de hidrógeno puede ocasionar daño generalizado a la célula, un ejemplo de esto es la oxidación de los grupos tioles susceptibles de las proteínas para formar ácido sulfénico (SOH) o sulfónico (SO_3H) (Paulsen y Carrol, 2010); sin embargo, bajos niveles de peróxido de hidrógeno mantienen modificaciones como la formación de disulfuros intra e intermoleculares, incluyendo disulfuros con bajo peso molecular como el glutati6n (Forman y col, 2010); así mismo, el peróxido de hidrógeno desempeña un papel importante como segundo mensajero en la transducci6n de se~ales por la modulaci6n del estado de oxidaci6n de las cisteínas sensibles al estado redox para promover la funci6n de las cinasas (Paulsen y Carrol, 2010). La regulaci6n y eliminaci6n del peróxido de hidrógeno previene la formaci6n y da~o causados por el radical hidroxilo, el cual puede ser formado por medio de la

reacción de Fenton entre el peróxido de hidrógeno y metales como el Fe^{2+} (Jhonson y col, 2012). Intracelularmente, la reacción de Fenton es limitada, en parte por la falta de suministro libre de metales en la célula, pero puede tener un papel muy importante bajo condiciones de estrés oxidativo como en el caso de la isquemia-reperfusión u otros procesos que involucran la acumulación intracelular de altos niveles de peróxido de hidrógeno y la liberación de Fe^{2+} procedente de diferentes sitios de almacenamiento intracelular (Jhonson y col, 2012; Eto y col, 2011).



Figura 4. Estrés oxidativo generado por ROS. La producción de ROS activa a los sistemas antioxidantes endógenos como glutatión, catalasa y SOD. Superóxido (O_2^-); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); Glutatión Peroxidasa (GPx); catalasa (CAT); óxido nítrico (NO^\bullet); peroxinitrito (ONOO^-); Radical hidroxilo (HO^\bullet). Tomado y modificado de Aoyama y col, 2008.

Además del estrés oxidativo generado en condiciones basales, durante la isquemia el cerebro produce radicales libres de manera exacerbada, tanto ROS como RNS, siendo el óxido nítrico (NO^\bullet) un radical ampliamente estudiado en este proceso por ser un gas altamente reactivo que además de ser un oxidante, puede reaccionar con el anión superóxido dando como resultado al peroxinitrito (ONOO^-), compuesto tóxico que provoca la oxidación de proteínas, lípidos y ADN, así como la inactivación de las enzimas mitocondriales, provocando una falla en la producción de energía y a su vez la producción de más radicales libres por la desregulación del

funcionamiento mitocondrial y la cadena transportadora de electrones (Arai y col, 2011).

Según lo reportado por Guzmán López (2011) en el modelo de isquemia global por medio de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) con reperusión, la producción de óxido nítrico presenta diferencias estadísticamente significativas conforme transcurre el tiempo post-reperusión, presentándose la producción máxima del mismo a las 2 y 24 horas post reperusión, observándose que la zona de infarto es mayor a las 24 horas post-reperusión, además de que este proceso de daño es dependiente de la producción de NO•.

Entre los efectos nocivos provocados por el óxido nítrico y otros compuestos de estrés oxidativo se encuentra el daño a lípidos de las membranas de diferentes compartimientos y compuestos celulares, evento conocido como lipoperoxidación (Barrera, 2012).

5.3 Lipoperoxidación

El término Lipoperoxidación se refiere al deterioro oxidativo de los lípidos que contienen uno o más dobles enlaces, como los ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos, glicolípidos, así como el colesterol y sus ésteres (Lü y col, 2010). La lipoperoxidación presenta cuatro etapas: iniciación, propagación, descomposición y terminación. En este proceso las especies reactivas de oxígeno pueden atacar a los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados (PUFA) que contienen dobles enlaces y grupos metileno (CH₂-) e iniciar las reacciones en cadena de peroxidación por radicales libres evento oxidativo reversible a través de la reducción por enzimas peroxiredoxinas (PRX) y glutatión peroxidasas (GPX) (Hybertson y col, 2011; Lü y col, 2010; Grimsrud y col, 2008).

La descomposición de radicales lipoperóxidos o los intermediarios de lipoperoxidación como los hidroperóxidos de lípidos (PUFA-OOH) son inestables y

conducen a la generación de aldehídos reactivos (Forman y col, 2008) incluyendo a los aldehídos α,β -insaturados 4-hidroxinonenal (4-HNE), 4-oxononenal (4-ONE), 4-hidroxi-(2E)-hexenal (4-HHE), (2E)-hexenal, crotonaldehído y acroleína, así como a los dialdehídos glioxal y malonildialdehído (MDA), siendo la acroleína el más reactivo de todos (Grimsrud y col, 2008). El 4-Hidroxinonenal (HNE) es el producto de lipoperoxidación que ha mostrado mayor actividad biológica, y por esa razón es el más estudiado, mientras que la acroleína recibe menos atención porque se produce en menor cantidad en este proceso, aunque sea de naturaleza más electrofílica (Pizzimenti y col, 2013; Grimsrud y col, 2008). Estos productos pueden acumularse intracelularmente en altos niveles, siendo tóxicos (Grimsrud y col, 2008). Por sí mismos, los 4-Hidroxialquenos, el malonildialdehído (MDA) han sido considerados causantes de estrés oxidativo (Barrera, 2012), formando preferentemente aductos con nucleófilos como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas (Pizzimenti y col, 2013).

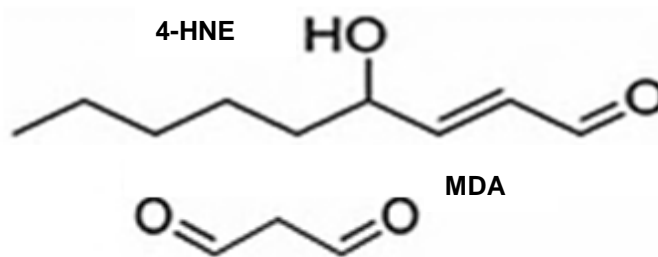


Figura 5. Estructura química de 4-HNE y MDA. Aldehídos altamente reactivos y principales componentes de la lipoperoxidación. Tomado y modificado de Pizzimenti y col, 2013.

5.3.1 Malonildialdehído

El malonildialdehído (MDA) (Figura 5) es ampliamente utilizado como marcador para la peroxidación de ácidos grasos ω_3 y ω_6 ; deriva de la descomposición de solo ciertos productos de lipoperoxidación aunque no es el único producto final de los mismos (Halliwell y Whiteman, 2004).

A pH neutro, el MDA está presente como ión enolato, con baja reactividad química, sin embargo es viable para interactuar con las bases de los ácidos nucleicos y formar diferentes aductos; además, cuando el pH disminuye, su actividad aumenta (Pizzimenti y col, 2013).

Ha sido reportado que el MDA reacciona *in vivo* con aminas primarias para formar Nε(2-propenal) lisina y generar puentes lisina-lisina (Pizzimenti y col, 2013).

El MDA a pH fisiológico interactúa con numerosos compuestos biológicos causando importantes efectos, tales como:

- Formar aductos estables con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y las aminas primarias
- Oxidar a la fracción B de lipoproteínas como LDL
- Formar aductos estables con el acetaldehído y posteriormente reaccionar de manera sinérgica y covalente con las proteínas para formar aductos MAA-proteínas.

Además, se ha estudiado su papel como pro-inflamatorio y pro-fibrogénico, así como su capacidad para inducir importante respuesta inmune (Pizzimenti y col, 2013).

5.3.2 4- Hidroxinonenal

El 4-Hidroxinonenal (4-HNE) (Figura 5) es un aldehído con alta actividad biológica y es el clásico representativo de los productos de lipoperoxidación (Pizzimenti y col, 2013).

El 4-HNE tiene tres grupos funcionales que pueden reaccionar fácilmente: el grupo aldehído, el doble enlace C=C y el grupo hidroxilo, por lo que se considera como altamente reactivo. Debido a su naturaleza altamente hidrofóbica, el 4-HNE está fuertemente asociado con las membranas donde es producido, pero puede también

difundir a diferentes compartimientos celulares. El 4-HNE es una molécula altamente electrofílica que fácilmente reacciona con glutatión, proteínas y ADN cuando se encuentra en alta concentración (Pizzimenti y col, 2013).

El 4-HNE interacciona con componentes celulares causando efectos nocivos como:

- Forma aductos con residuos aminoacídicos con preferencia en el siguiente orden: Cisteína, Histidina y Lisina, vía adición de Michael con los grupos amino (-NH₂) o tiol (-SH). Los residuos de Cisteína muestran una alta reactividad con el 4-HNE, aunque en condiciones fisiológicas no son su blanco preferencial porque la estructura terciaria de la proteína puede condicionar su accesibilidad (Doorn y Petersen, 2003).
- No se ha encontrado reacción del 4-HNE con residuos de Glutamato (Doorn y Petersen, 2003).
- Puede modificar la estructura de las proteínas a través de la formación de bases de Schiff con los residuos de lisina, llevando a la formación de pirroles (Pizzimenti y col, 2013)
- Las modificaciones por el 4-HNE pueden resultar en la unión de dos residuos de lisina a través de la formación reversible de aductos base de Schiff-Michael (Pizzimenti y col, 2013; Barrera y col, 2008).
- Ha sido detectado *in vivo* en numerosas condiciones patológicas caracterizadas por lipoperoxidación, incluyendo inflamación, aterosclerosis, enfermedades degenerativas crónicas del sistema nervioso central como el Alzheimer, enfermedades crónicas hepáticas y cáncer (Butterfield y col,2010; Young y col,2010; Moreau y col,2005).

En la Figura 6 se resumen la producción de aldehídos generados en el proceso de lipoperoxidación, reacciones y destinos celulares de estos productos.

Una forma rápida de detoxificar a los productos de peroxidación lipídica es mediante la enzima Glutatión transferasa Alfa 4 (GSTA4) que cataliza la conjugación de

aldehídos α,β -insaturados altamente reactivos con el glutatión, para posteriormente ser transportados extracelularmente por el Transportador tipo 1 de vinculación a proteínas (RalBP-1). Adicionalmente, la oxidación por la aldehído deshidrogenasa o la reducción por la alcohol deshidrogenasa, la aldehído reductasa o la aldosa reductasa convierte los aldehídos libres en moléculas menos tóxicas (Grimsrud y col, 2008).

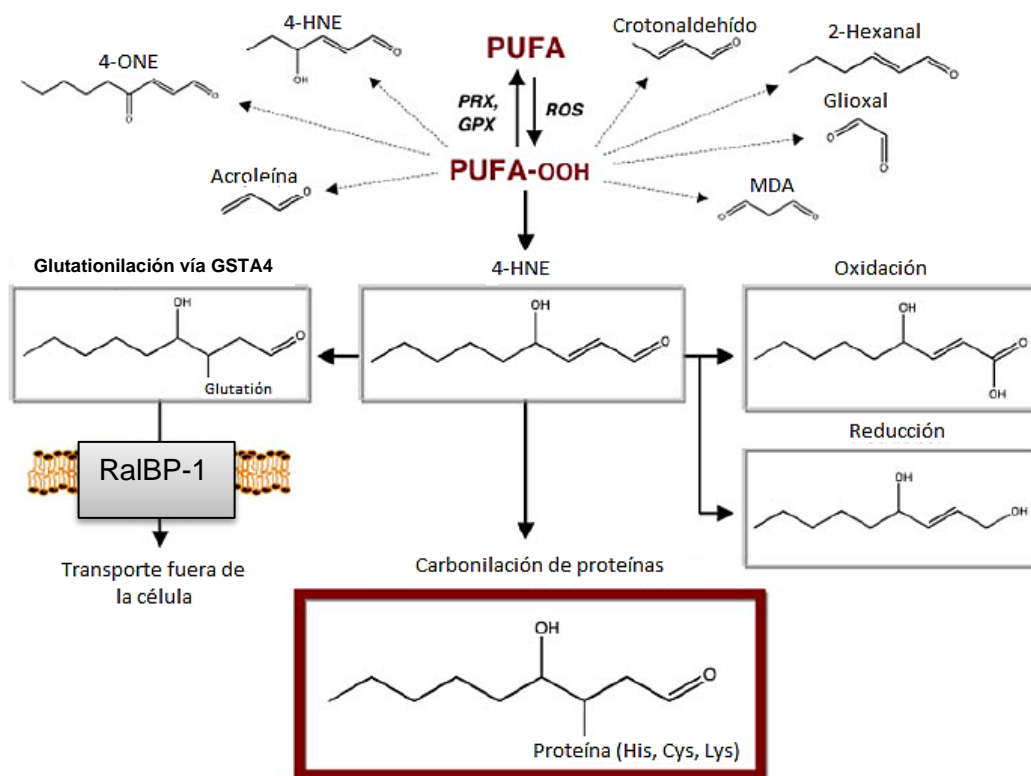


Figura 6. Destinos celulares de los aldehídos α,β -insaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) sufren daño oxidativo por las especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo compuestos altamente reactivos como el malonildialdehído y los 4-hidroxi-laquenales, que pueden ser finalmente transportados fuera de la célula vía conjugación con una Glutatió transferasa, sufrir reacciones de oxidación y reducción hacia compuestos menos reactivos, o provocar carbonilación de proteínas por su reacción con residuos de histidina, cisteína o lisina. Tomado y modificado de Grimsrud y col, 2008.

Cuando la concentración de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno se incrementan, en procesos como la isquemia cerebral; se desencadena una serie de reacciones para contrarrestar los efectos nocivos de las mismas, activando

diferentes sistemas antioxidantes endógenos como el glutatión, la superóxido dismutasa y la catalasa, entre otros, los cuales colaboran para mantener el equilibrio del estado redox y la homeostasis celular.

5.4 Glutatión

El glutatión es el péptido no proteico más abundante en las células de mamíferos, está compuesto por los aminoácidos L-glutamato, L-cisteína y glicina conformando al γ -glutamil-cisteinil-glicina (Figura 7). Una característica muy importante es que los residuos de L-glutamil y L-cisteinil están unidos a través del grupo γ -carboxilo del L-glutamato, lo que hace al enlace más resistente a la mayoría de las proteasas (Lash, 2011; Chen y col, 2013), este compuesto contiene en su estructura al grupo tiol, responsable de su actividad redox (Lash, 2011; Chen y col, 2013; Martínez-Sámamo y col, 2011; Franco y Cidlowski, 2009).

El glutatión está presente en las células en su forma reducida (GSH), manteniendo al grupo tiol libre, y oxidada (GSSG) en la que el grupo tiol se encuentra unido a otro, manteniéndose en una relación GSH:GSSG típicamente en el cerebro de 99-100:1 (Aoyama y Nakaki, 2012; Aoyama y Nakaki, 2013), y en una concentración intracelular de 0.2 a 10mM, siendo más usual en la mayoría de las células incluyendo las neuronas alrededor de 1- 2mM (Jhonson y col, 2012), distribuido en diferentes regiones cerebrales, encontrando su mayor concentración en la corteza, seguido por el cerebelo, hipocampo y el estriado, mientras que la concentración más baja se ha encontrado en la sustancia nigra (Aoyama y Nakaki, 2013).

Se ha reportado que los astrocitos tienen niveles de glutatión más altos que las neuronas y también que tienen habilidad para secretar glutatión al espacio extracelular (Dringen, 2000).

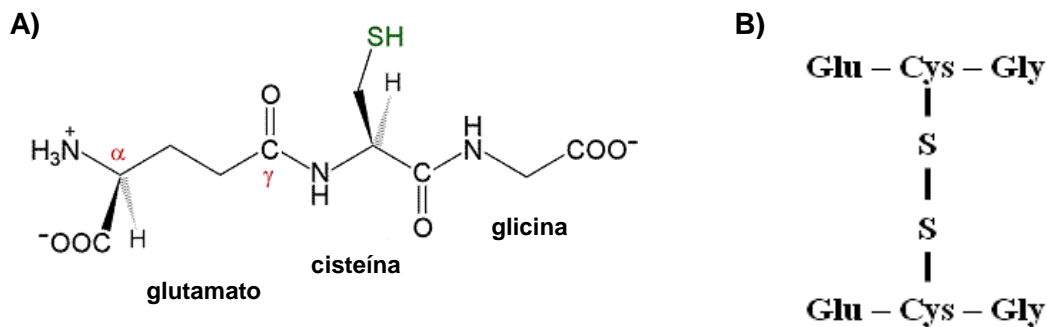


Figura 7. Estructura química de glutatión. A): Estructura química de glutatión reducido; B): Representación esquemática de glutatión oxidado. Tomado y modificado de Cronk, 2002; Martínez-Sámano y col, 2011.

5.4.1 Síntesis de GSH

Entre el 85 – 90 % del GSH libre se encuentra distribuido en el citosol, lugar donde se sintetiza, posteriormente se distribuye a otros organelos incluyendo la mitocondria, los peroxisomas, la matriz nuclear y el retículo endoplásmico (Chen y col, 2013; Franco y Cidlowski, 2009).

En tejido neuronal, las células deben tener una gran cantidad de cisteína proveniente del espacio extracelular.

La incorporación de cisteína al interior de las neuronas y astrocitos ocurre por dos mecanismos principales: las neuronas usan canales transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) dependientes de sodio (Aoyama y col, 2008); mientras que los astrocitos usan los transportadores de cistina/glutamato (Xc^-) para incrementar los niveles intracelulares de cisteína a partir de cistina (la forma oxidada de la cisteína). Adicionalmente, las células pueden generar cisteína utilizando polipéptidos intracelulares como precursores en proceso de transulfuración (Jhonson y col, 2012).

El suministro de glutamato neuronal es mediado por EAAC1 (canales transportadores de aminoácidos excitatorios tipo C1) (Aoyama y col, 2008); mientras

que la glicina utilizada en la síntesis de glutatión proviene en su mayoría del ciclo de metabolismo del mismo (Figura 8) (Aoyama y col, 2008).

La síntesis de glutatión se lleva a cabo en el citoplasma por la acción secuencial de dos pasos enzimáticos dependientes de ATP: la γ -glutamil cisteín ligasa (GCL) media la primera reacción entre el glutamato y la cisteína para formar un dipéptido: el γ -glutamil-cisteína (γ GluCys), que posteriormente reacciona con la glicina en una reacción catalizada por la Glutatión sintetasa (GS) para producir GSH (Figura 8) (Jacob y col, 2006).

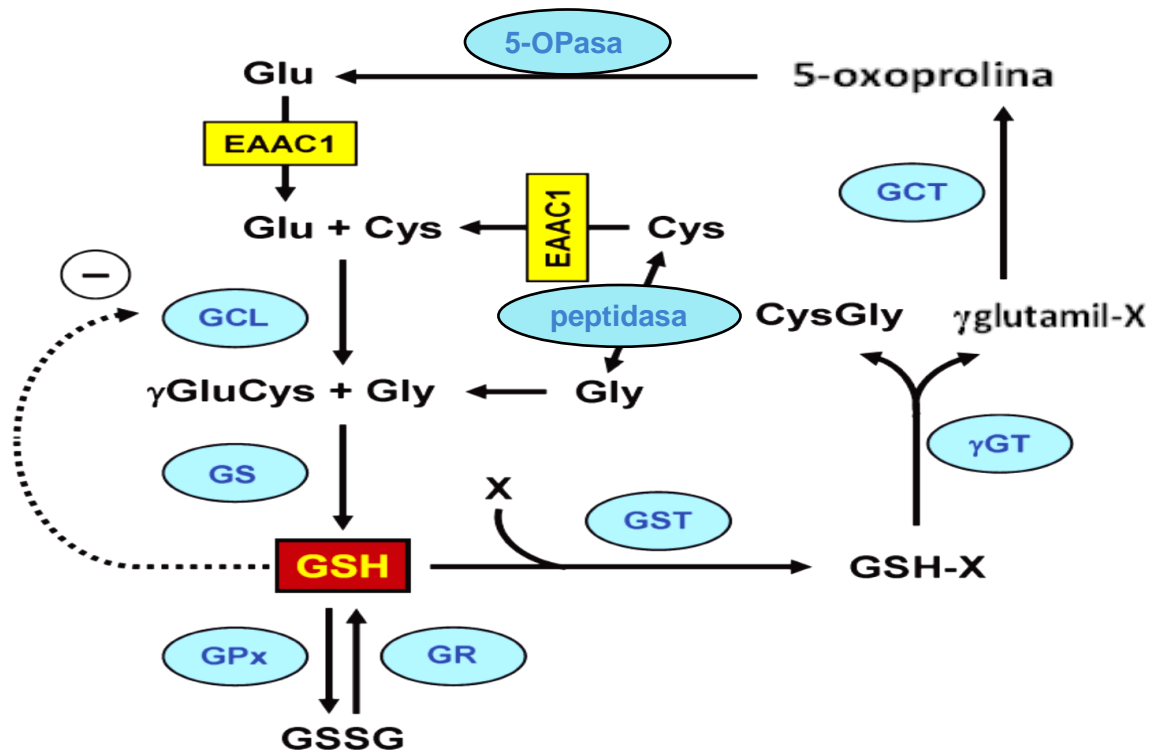


Figura 8. Ciclo de síntesis, función y metabolismo de glutatión. El sistema antioxidante glutatión cumple su función a través de diferentes enzimas involucradas en su síntesis, su ciclo de óxido-reducción y su metabolismo. Abreviaturas: glutamato (Glu); cisteína (Cys); glicina (Gly); γ -glutamilcisteína (γ GluCys); cisteinilglicina (CysGly); glutatión oxidado (GSSG); glutatión reducido (GSH); compuestos que pueden formar conjugaciones con GSH (X); γ -glutamilcistein ligasa (GCL); glutatión sintetasa (GS); glutatión peroxidasa (GPx); glutatión reductasa (GR); glutatión S-transferasa (GST); γ -glutamiltransferasa (γ GT); γ -glutamilciclotransferasa (GCT); 5-oxoprolinasa (5-OPase). Tomado de Aoyama y col, 2008.

Aunque la mitocondria contiene del 5–15 % del glutatión total celular, no sintetiza por si misma glutatión por falta de actividad de γ -glutamil cisteín ligasa (Aoyama y col, 2008).

El glutatión es metabolizado extracelularmente por γ -glutamil transferasas (γ GTs) ancladas a la membrana, cuando el glutatión es transportado a través de ella γ GT cataliza la ruptura dependiente de ATP del enlace amida del γ –glutamil y transfiere el residuo glutamil a otro aminoácido.

Esta reacción también genera cisteinilglicina con un enlace estándar α -amida que es escindido por una dipeptidasa extracelular, produciendo cisteína y glicina libres que pueden ser utilizadas después por la célula (Chen y col, 2013).

El paso limitante para la síntesis de GSH es la formación del enlace amida entre el gama carboxilo del glutamato y el amino de la cisteína. La tasa de síntesis de glutatión se basa tanto en la disponibilidad de la cisteína como en la regulación de la actividad de la enzima GCL, por medio de su inhibición por retroalimentación de GSH (Figura 8) (Jhonson y col, 2012). Una disminución de la concentración de glutatión puede ser el resultado de una baja de actividad de las enzimas GCL y GS (Aoyama y col, 2008).

Aunque la actividad de GS es inhibida por óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) aún son inciertos los mecanismos regulatorios. Algunos reportes describen que la exposición a especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno pueden incrementar la concentración de GSH debido a un incremento en su tasa de síntesis (Aoyama y col, 2008).

5.4.2 Funciones de Glutatión

El glutatión ejerce sus funciones por varios mecanismos, los cuales se explican en la Tabla 5.

Tabla 5. Principales funciones del glutatión.

Proceso	Participación del glutatión
Principal antioxidante en el cerebro	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reaccionar de manera no enzimática con el superóxido, óxido nítrico, hidroxilo y peroxinitrito. ✓ Donador de electrones para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la Glutatión peroxidasa. ✓ Eliminación de radicales libres mediante el metabolismo de glutatión donde participan Glutatión peroxidasa, Glutation reductasa, y glutatión – S - Transferasa <ul style="list-style-type: none"> ✓ En reacciones catalizadas por la Glutatión -S- transferasa (GST), reacciona con componentes endógenos y xenobióticos, incluyendo a productos de lipoperoxidación como el 4-HNE, para formar una mezcla de disulfuros, y exportarlos celularmente. ✓ Protege la funcionalidad de las proteínas al formar mezclas de disulfuros entre los grupos tioles (S- glutationilación) ✓ Reservorio endógeno de NO en la forma de S- nitrosoglutatión (GSNO),
Contribuye a mantener el equilibrio redox	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Actua como buffer redox manteniendo homeostasis redox intracelular.
Proliferación y diferenciación neuronal	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Regulación de la señalización celular ✓ Regulación de la función de otras proteínas y expresión genética. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Neuromodulador y neurotransmisor.
Otros procesos	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Almacena y transporta cisteína. ✓ Cofactor esencial para enzimas.

Fuente: Aoyama y Nakaki, 2013; Ostrakhovitch y Semenikhin, 2013; Franco y Cidlowski, 2009; Circu y Aw, 2008.

Además de ser el principal antioxidante en el cerebro y contribuir a mantener el equilibrio redox, estudios recientes han demostrado la participación de glutatión en diversos procesos celulares en el cerebro, tales como la detoxificación de xenobióticos, regulación de la función proteica y expresión genética (Aoyama y Nakaki, 2013; Franco y Cidlowski, 2009), además de ser requerido para la proliferación y diferenciación neuronal (Ostrakhovitch y Semenikhin, 2013) y estar involucrado tanto en la regulación de la función celular como en la regulación de mecanismos de apoptosis (Franco y Cidlowski, 2009; Circu y Aw, 2008).

5.5 Glutatión transferasa

5.5.1 Aspectos estructurales y clasificación de Glutatión transferasa

Las GSTs comprenden un importante grupo de enzimas encontradas en todas las clases de células eucariotas y en las bacterias, incluyendo a las 18 GSTs expresadas en humanos (Atkinson y Babbitt, 2009).

Las GSTs son típicamente proteínas homodiméricas aunque es posible encontrar heterodímeros, están compuestas por subunidades de 25-30 kDa que presentan dos dominios. El dominio N terminal incluye el sitio de unión al glutatión y tiene una topología $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, y el dominio C-terminal está compuesto enteramente de α -hélice helicoidal (α) (Board y Menon, 2013).

La actividad de las GST es críticamente importante en los sistemas biológicos. Están agrupadas principalmente en 4 familias de enzimas: proteínas de resistencia a fosfomicina, proteínas de membrana asociadas a metabolismo de eicosanoides y glutatión (MAPEG), GSTs Kappa y GSTs citosólica (Board y Menon, 2013; Atkinson y Babbitt, 2009).

Las proteínas resistentes a fosfomicina son GSTs de procariontes y representan una familia de proteínas solubles que catalizan inactivación de la fosfomicina (ácido

1R,2S-epoxipropilfosfórico), un antibiótico de amplio espectro, a través de su conjugación con glutatión (Board y Menon, 2013).

Las MAPEG son una familia de proteínas cuyos miembros presentan actividad de glutatión transferasa, siendo la MGST1 la que más se ha caracterizado, constituyendo un 3 % de las proteínas del retículo endoplásmico en hígado de rata y 5 % de la membrana mitocondrial externa (Morgenstern, 2005).

Las GSTs clase Kappa son enzimas solubles y algunos sustratos específicos son similares a las de las GST citosólicas, de manera que fueron originalmente nombradas y consideradas como un miembro distante de la familia de GST citosólicas. Posteriormente, los análisis de secuenciación y estudios estructurales revelaron que tienen un origen evolutivo distinto. Las GST clase Kappa son expresadas en la mitocondria y peroxisomas de mamíferos. Los análisis de la secuencia filogenética indican que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pero están notablemente ausentes en los insectos. Solo una clase de enzimas GSTs Kappa ha sido identificada en humanos pero aún no se sabe claramente su función fisiológica. El papel potencial de GSTK1-1 en la oligomerización de adiponectina ha sido sugerido, pero estudios con ratones knockout no han sido suficientes para sustentarlo (Morel y Aninat, 2011).

La superfamilia de las GST citosólicas (Figura 9) es la más extensamente estudiada y se encuentra presente en diferentes formas de vida, muchos estudios realizados en hígado muestran que la GST citosólica contribuye con más del 10 % de las proteínas solubles, aunque también se encuentra distribuida en muchos tejidos. Además, la GST citosólica es la mejor conocida por su capacidad para catalizar reacciones de conjugación de Fase II entre el glutatión reducido GSH y sustratos electrofílicos, por lo que generalmente el término GST se refiere a esta enzima (Board y Menon, 2013).

En el humano la familia de las GST citosólicas puede ser clasificada en 7 distintas clases de enzimas catalíticas activas denominadas como Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta,

Zeta y Omega. Las proteínas de cada clase son llamadas por la letra inicial del nombre de la clase. Por ejemplo: GSTA1-1 específica al producto homodimérico de la clase Alpha gen 1, y GSTA1-2 específica al producto heterodimérico de los genes GSTA1 y GSTA2. Cada clase está representada en el genoma humano por un número variable de genes (Board y Menon, 2013; Dulhunty y col, 2001).

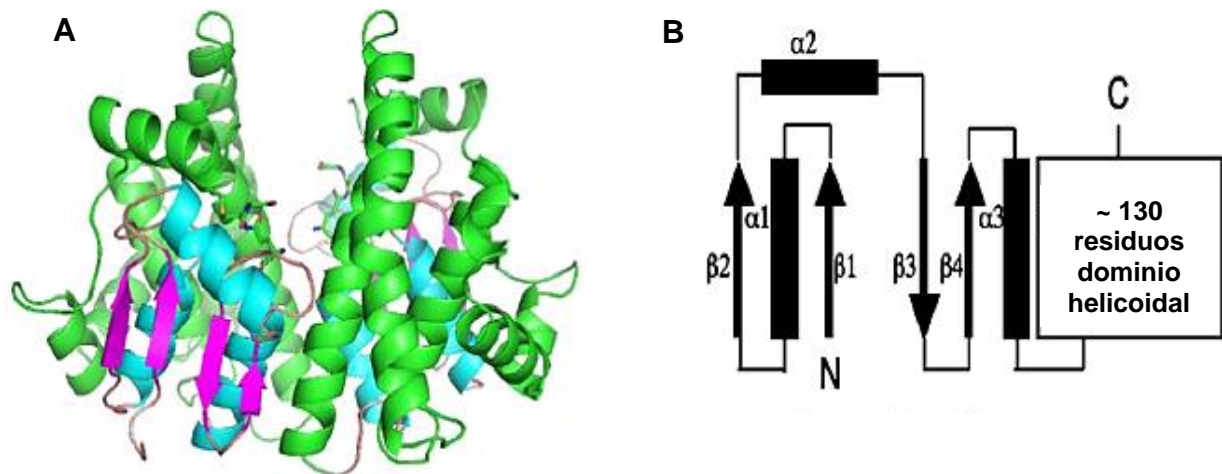


Figura 9. Representación esquemática de la estructura de Glutación transferasa citosólica. A: dímero GSTA1-1, las α -helices del dominio N-terminal se muestran en azul y las α -helices del dominio C-terminal se muestran en verde, las estructuras β se muestran en magenta y los bucles en naranja. B: Representación esquemática de GST citosólica. Tomado y modificado de Board y Menon, 2013.

5.5.2 Funciones de Glutación transferasa

Las GSTs catalizan un amplio rango de reacciones que involucran la adición de glutatión (GSH) a otro compuesto, siendo su función principal la detoxificación celular, conjugan compuestos no polares incluyendo xenobióticos, fármacos, pesticidas que llevan centros electrofílicos, con GSH, formando conjugados solubles en agua que son transportados extracelularmente mediante bombas, así como otras funciones que describen en la tabla 6 (Board y Menon, 2013; Atkinson y Babbitt, 2009; Townsend y col, 2009).

Tabla 6. Funciones de Glutación transferasa

Proceso	Participación de Glutación transferasa
	Detoxificación de ROS, RNS y xenobióticos
Participación en señalización celular	JNK, ASK1, MAP cinasas
Desregulación asociada con patologías	Parkinson, Alzheimer
Reacciones de isomerasa	Biotransformación de α -haloácidos como el ácido dicloroacético, ceto-esteroride isomerasas, isomerasa en síntesis de prostaglandinas.
Glutationilación.	Cataliza la formación reversible de enlaces disulfuros entre los grupos tioles de las proteínas y glutatión

Fuente; Board y Menon,2013; Atkinson y Babbitt, 2009; Townsend y col, 2009.

Adicionalmente, el papel de las GSTs es eliminar a los radicales libres producidos de manera endógena a través del ciclo del glutatión, así como la capacidad de conjugar a los productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxinonenal (Higgins y Hayes, 2011; Atkinson y Babbitt, 2009).

5.5.3 Mecanismo de Glutación transferasa

El modelo tradicional de sustrato para análisis de la actividad de conjugación de la GST es el de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) por la alta reactividad de este sustrato con la mayoría de las isoformas de las GSTs, sin embargo, existen algunas diferencias entre el mecanismo enzimático dependiendo de las características del sustrato, encontrándose mecanismos como la sustitución nucleofílica bimolecular para sustratos con no aromáticos hibridación sp^3 y centros electrofílicos, la adición de Michael para sustratos no aromáticos con hibridación sp^2 y centros electrofílicos (Figura 10 A) y para sustratos aromáticos como el CDNB se lleva a cabo una reacción de sustitución nucleofílica aromática con una reacción de adición-eliminación (Deponete, 2013).

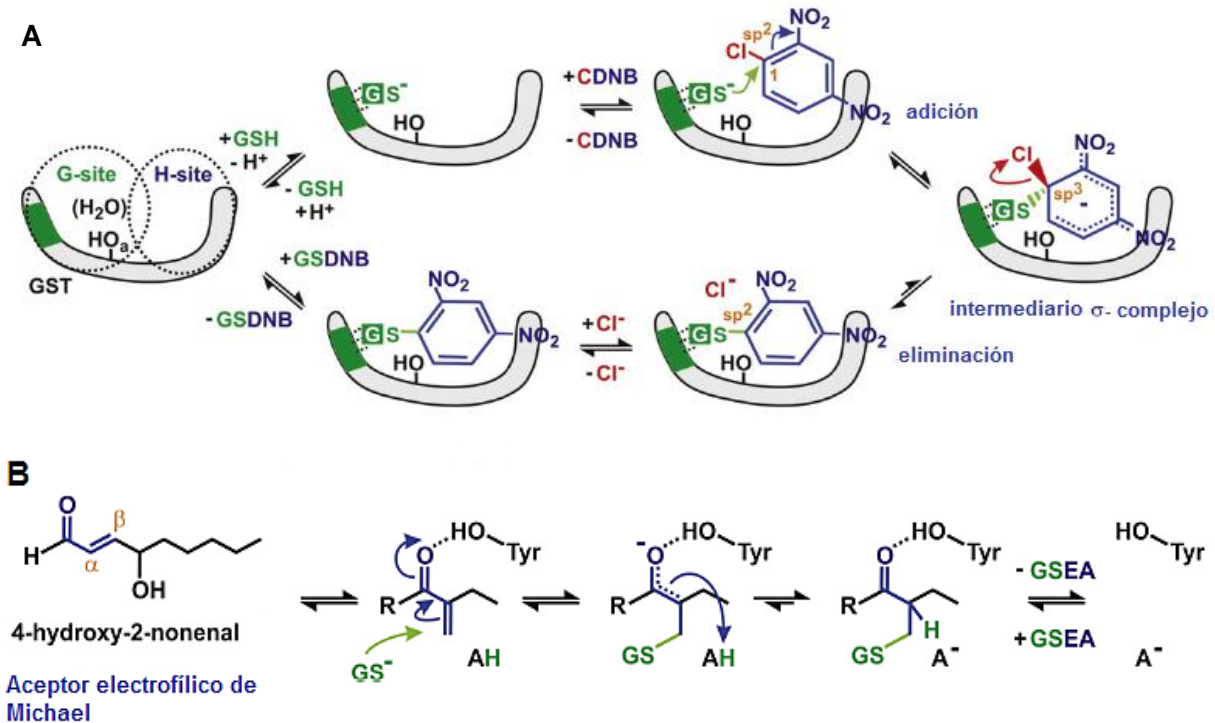


Figura 10. Modelos de conjugaciones y reducciones catalizadas por Glutatión transferasas. A: Mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular de CDNB catalizado por GST. B: Mecanismo para sustratos no aromáticos con hibridación sp^2 y centros electrofílicos. Tomado y modificado de Deponete, 2013.

Como se ha mencionado anteriormente, los principales productos de lipoperoxidación son los aldehídos α,β -insaturados 4-hidroxi-2-nonenal y malonildialdehído, por lo que cumplen con la característica de ser moléculas de sustratos no aromáticos con hibridación sp^2 y centros electrofílicos de reacción, de manera que son excelentes aceptores de Michael, y la adición nucleofílica de glutatión a estos sustratos es un caso especial de la misma, llevándose a cabo el siguiente mecanismo presentado en la Figura 10 B. Dependiendo de la enzima investigada, se ha sugerido un determinado residuo aminoacídico que activa al GSH, el donador de Michael; por ejemplo, en la GST P-1-1 de humano es solo el residuo Tyr₉ el que cumple con esta función, mientras que en la GST A4-4 son los residuos Tyr₉ y Arg₁₅ los encargados de esta actividad. Después del ataque nucleofílico del

tiolato, el primer estado de transición y el intermediario enolato probablemente se estabilizan por el residuo Tyr₁₀₈. Este residuo se localiza al final de la primera hélice en el dominio α -helicoidal. La subsecuente protonación del átomo de C α del sustrato depende de la activación del residuo Arg₁₅ por una molécula de agua, o de un ácido no identificado. El siguiente paso es estereoselectivo y los análisis han revelado una reacción reversible de otro aceptor de Michael. Finalmente, los estudios cinéticos de GST P1-1 de humano sugieren que la actividad de la enzima no es limitada por la liberación de los productos conjugados (Deponete, 2013).

5.6 Glutación reductasa

5.6.1 Aspectos estructurales y clasificación de Glutación reductasa

Las Glutación reductasas son una familia de enzimas que también incluyen enzimas tripanotión reductasas, ión mercúrico reductasas y dihidrilipoamida deshidrogenasas. Las isoformas de Glutación reductasa de eucariotes son homodímeros estables de ~110 kDa (Figura 11). Cada subunidad contiene sitios de unión a FAD, a NADPH. Se han encontrado diferentes isoformas de Glutación reductasa en el citosol, matriz mitocondrial y cloroplastos (Deponete, 2013).

5.6.2 Funciones de Glutación reductasa

La Glutación reductasa (GR) cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) en dos moléculas de glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como cofactor y donador de electrones y FAD como grupo prostético, por lo que es catalogada como una flavoenzima (Deponete, 2013; Berkholz y col, 2008). Funcionalmente, la Glutación reductasa es una NADPH: GSSG oxidoreductasa, que tiene dos sustratos: NADPH con H⁺ y GSSG, y dos moléculas de GSH como productos (Deponete, 2013).

Esta enzima tiene un papel central en el metabolismo de glutatión, participa fundamentalmente en el equilibrio del estado redox celular al mantener alta la concentración de GSH y bajos los niveles de GSSG (Deponte, 2013).

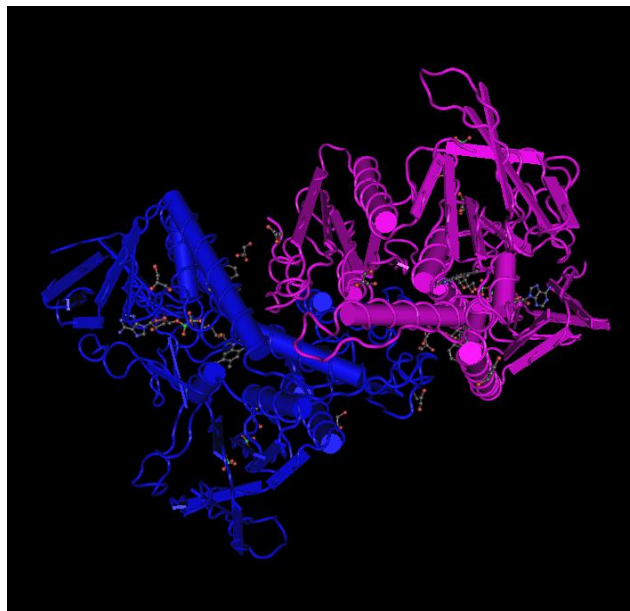


Figura 11. Representación esquemática de la estructura de Glutatión reductasa. Tomado de base de datos de NCBI.

5.6.3 Mecanismo de Glutatión reductasa

El mecanismo de la Glutatión reductasa es un mecanismo conocido como de ping-pong e involucra dos pasos acoplados que involucran una mitad reductora y una mitad oxidante. Primero, la enzima se reduce por el NADPH, luego los electrones son transferidos al GSSG, regenerando la enzima oxidada (Figura 12) (Deponte, 2013).

Mitad reductora de la reacción (Figura 12): La glutatión reductasa oxidada (GR_{ox}) contiene dos residuos esenciales de cisteína que forman un puente disulfuro en la parte donde se encuentra un anillo de isoaloxazina, cerca de un residuo de histidina que a su vez forma un puente de hidrógeno con un residuo de glutamato, ambos proceden de la segunda subunidad del homodímero. Para una unión rápida de

NADPH, el residuo de Tyr al que se une (TyrNADPH), rota fuera del anillo de isoaloxazina y sujeta al NADPH. El hidrógeno transferido del NAPH reduce al FAD a FADH^- el cual subsecuentemente traslada el par electrónico al residuo de cisteína más próximo (CysCTC) rompiendo el puente disulfuro que estaba formando con el residuo de cisteína Cys_{int} . El grupo tiolato del residuo CysCTC forma un complejo estable de transferencia de carga con el anillo de isoaloxazina formado, mientras el residuo Cys_{int} puede ser protonado por el residuo de histidina. En el final de la mitad reductiva de la reacción, el NADP^+ se disocia de la enzima que ahora queda reducida, y es reemplazada por otra molécula de NADPH (Deponte, 2013).

Mitad oxidante de la reacción (Figura 12): Para una unión rápida del GSSG, el residuo de Tyr al que se une (TyrGSSG) es reposicionado de manera que el grupo hidroxilo contacta con el puente disulfuro del sustrato. Adicionalmente, el GSSG es enlazado por otros residuos provenientes de ambas subunidades, que incluyen cuatro cargas positivas y dos negativas para compensar las cargas de este sustrato. Después de la unión del sustrato, el residuo de Cisteína del GSSG es atacado por el residuo Cys_{int} de la enzima, resultando en la formación de un puente disulfuro intermolecular. Este ataque nucleofílico puede ser acelerado a través de la desprotonación del grupo tiol del residuo Cys_{int} por el residuo de histidina (His'), también se ha sugerido que el residuo de His' protona el grupo tiolato saliente de CysII de del GSSG el cual es liberado en la reducción del GSSG. Una vez que la primera molécula de GSH es liberada (GSH II), el puente disulfuro intermolecular es atacado en el átomo de azufre del residuo de Cys_{int} por el tiolato de CysCT. Del grupo saliente tiolato de la segunda molécula de GSH (GSHII) puede ser protonado otra vez por His (Deponte, 2013).

5.7 Glutación peroxidasa

5.7.1 Aspectos estructurales y clasificación de Glutación peroxidasa

La GPx fue descrita por primera vez por Mills en 1957 como una enzima del eritrocito que específicamente reduce el H_2O_2 mediante glutatión para proteger a la hemoglobina del daño oxidativo (Toppo y col, 2009).

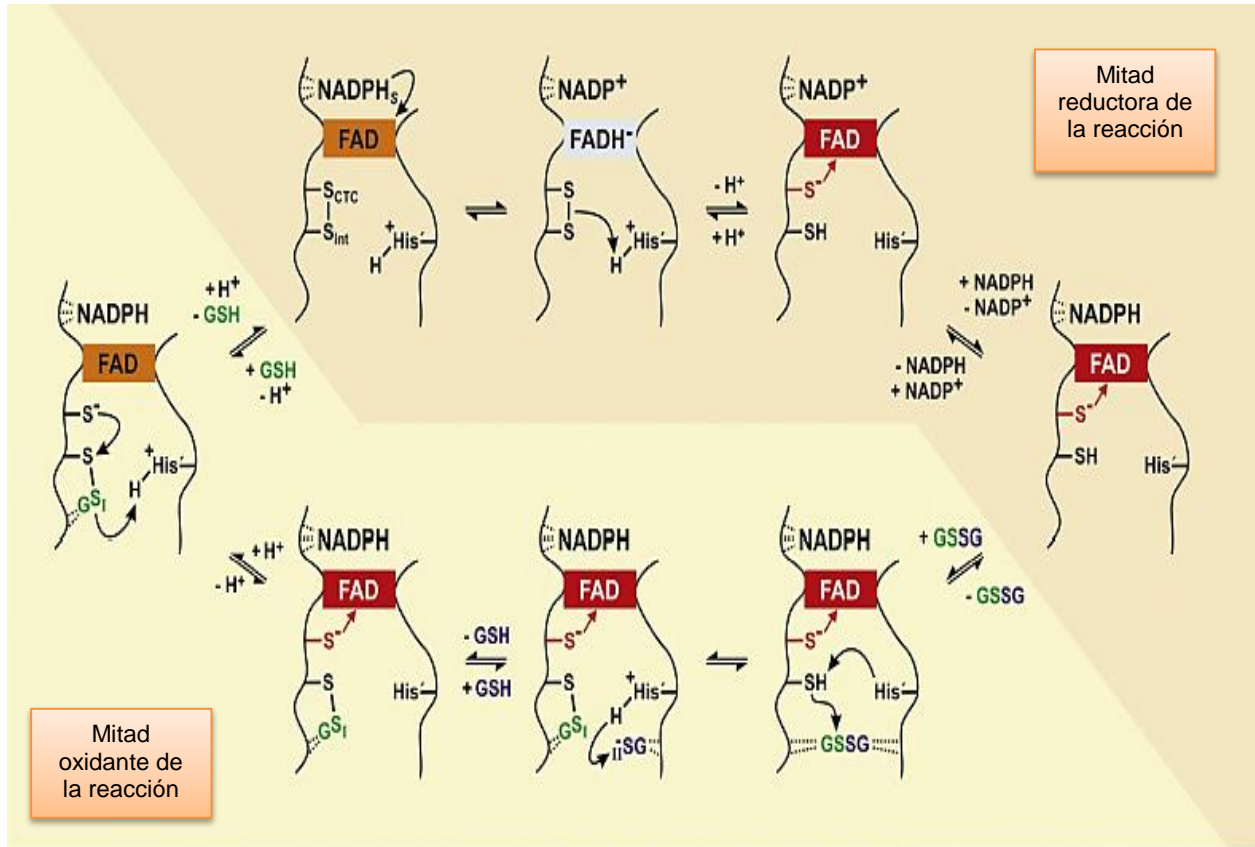


Figura 12. Representación esquemática del mecanismo de actividad catalítica de Glutación reductasa. Participan en el mecanismo de actividad catalítica de GR ambas subunidades de la enzima, FAD, y los sustratos NADPH, H^+ y GSSG. Tomado de Deponte, 2013.

Actualmente se conoce que la Glutación peroxidasa conforma una familia integrada por 8 miembros, siendo GPx 1,2,3,5, y 6 homotetrámeros (Figura 13), lo que podría determinar su especificidad por hidroperóxidos solubles de bajo peso molecular; mientras que GPx 4, 7 y 8 son monómeros probablemente permitiendo la reacción con hidroperóxidos lipídicos más complejos, sin embargo, hasta ahora es solo probado para GPx4. GPx3 es una excepción en tanto que aparentemente acepta hidroperóxidos complejos como lo hacen los monómeros.

La GPx 1 a la 4 son las selenoproteínas más abundantes en los mamíferos; contienen una selenocisteína (Sec) en el centro catalítico. Se ha sugerido que la

presencia del sitio catalítico Sec es para garantizar la rápida reacción con el hidroperóxido y la rápida reducción por el GSH (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

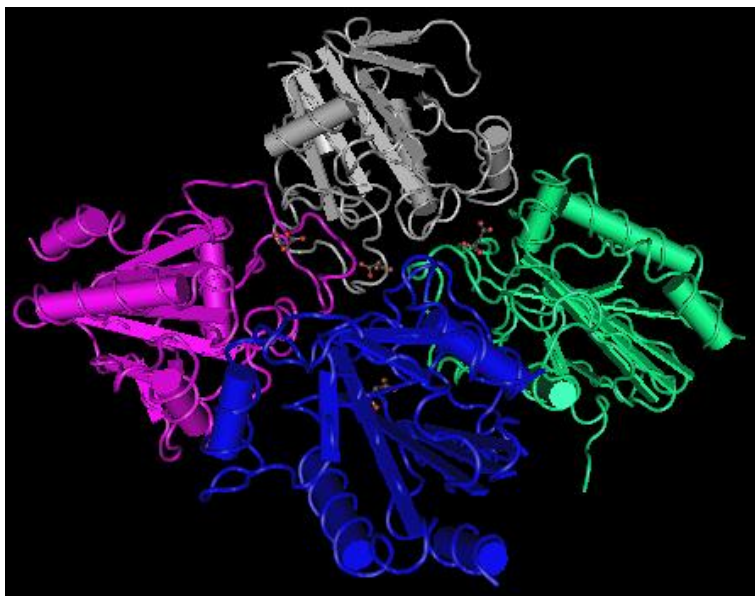


Figura 13. Representación esquemática de los tetrámeros de Glutación peroxidasa. Fuente: base de datos de NCBI.

Este grupo de enzimas desempeñan función antioxidante en diferentes localizaciones y compartimientos celulares: GPx1 es de localización ubicua, en la célula se localiza principalmente en el citosol y la mitocondria, GPX2 se encuentra en el epitelio intestinal y se desconoce su ubicación intracelular; GPX3 se localiza en el plasma, estas tres enzimas trabajan en fase acuosa, mientras que GPx4 protege a las membranas del daño oxidativo encontrándose intracelularmente en la mitocondria, núcleo y citosol (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013) (Tabla 7).

5.7.2 Funciones de Glutación peroxidasa

La Glutación peroxidasa cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros hidroperóxidos orgánicos a agua o los correspondientes alcoholes, usando típicamente glutatiión (GSH) como agente reductor (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013) por lo que se le atribuye una función primordial en la protección celular, sin embargo,

una exagerada concentración de esta enzima o un aumento descontrolado y persistente de su actividad provocado bajo ciertas condiciones fisiológicas como el daño mecánico a la vasculatura, o condiciones patofisiológicas como cardiomiopatías, también puede traer efectos dañinos importantes (Lubos y col, 2011).

Tabla 7. Características estructurales y sustratos de Glutación peroxidasas de mamíferos.

Tipo de GPx de mamífero	Residuo peroxidante	Homo-tetrámero	Sustrato reductor	Sustrato oxidante
GPX1	Sec	Sí	GSH	H ₂ O ₂ soluble LOOH ROOH Peroxinitrito
GPx2	Sec	Sí	No identificado	No identificado
GPx3	Sec	Sí	GSH Baja tasa con Trx y Grx	H ₂ O ₂ soluble LOOH ROOH PLOOH
GPx4	Sec	No	GSH, STT, Mercaptoetanol, Cisteína (de las proteínas con tioles).	H ₂ O ₂ soluble LOOH ROOH PLOOH ChOOH CEOOH Peroxinitrito
GPx5	Cys	Si	No identificado	No identificado
GPx6	Sec en humanos Cys en ratas y ratones	Si	No identificado	No identificado
GPx7	Cys	No	GSH, PDI	H ₂ O ₂
GPx8	Cys	No	GSH, ¿PDI?	H ₂ O ₂

Abreviaturas: ChOOH: hidroperóxido de colesterol; CEOOH : hidroperóxido de éster de colesterol; DTT: ditiotreitól; Grx: glutaredoxina; LOOH: hidroperóxido de lípido; PLOOH: hidroperóxido de fosfolípido de diferentes clases; ROOH: hidroperóxidos sintéticos pequeños (por ejemplo hidroperóxido de ter-butilo); Trx: tiorredoxina; PDI: proteína disulfuro isomerasa. Tomado de Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013.

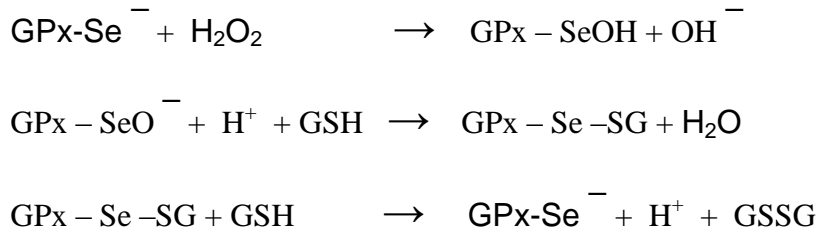
También se ha reportado que la GPx-1 protege contra estímulos inflamatorios que pueden promover estados proaterogénicos y fomentar carcinogénesis. Adicionalmente, la GPx-1 previene la mutagénesis del ADN disminuyendo de esta

manera una posible carcinogénesis. Adicionalmente, la eliminación de ROS puede preservar la bioviabilidad del óxido nítrico contribuyendo a conservar la función vascular que se ve afectada durante procesos trombóticos y aterogénicos (Lubos y col, 2011). Por este motivo GPx-1 puede disminuir la pérdida celular por apoptosis durante un proceso de isquemia-reperfusión (incluyendo tanto coronaria como neuronal), y proteger a las células altamente susceptibles a ROS como los islotes de las células β pancreáticas (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). Según lo reportado por Crack y col en el 2001, Gpx-1 tiene un papel importante en la protección de células neuronales en respuesta a condiciones extremas de estrés oxidativo como el proceso de isquemia – perfusión, en el que pudieron observar un incremento en el volumen de infarto en ratones knockout para la GPX-1 con respecto a ratones control.

Entre los efectos dañinos que puede traer consigo un exceso de GPx se encuentran proveer una mayor resistencia y crecimiento tumoral al proteger a las células tumorales de las ROS. Además, la eliminación de oxidantes esenciales puede llevar a un desequilibrio redox inclinándolo hacia un estrés reductivo caracterizado por la pérdida de las respuestas fisiológicas normales incluyendo la disminución de la respuesta vascular al peróxido de hidrógeno y al ácido araquidónico, disminuyendo la función mitocondrial y la señalización de los factores de crecimiento, lo que tiene diversos efectos incluyendo una insensibilidad a la insulina y disminución de la proliferación celular, manifestándose en afecciones importantes como las cardiomiopatías por mecanismos que aún no se han comprendido en su totalidad pero que se presume que involucra la disminución de niveles esenciales de peróxido de hidrógeno (Lubos y col, 2011).

5.7.3 Mecanismo de Glutación peroxidasa

El selenol (SeH) en las SecGPxs reacciona en forma de selenolato con H_2O_2 para formar ácido selénico (SeOH) el cual es reducido otra vez para formar SeH por 2 GSH formando GSSG y agua, como se muestra en las siguientes reacciones:



El ciclo catalítico comprende dos eventos independientes: oxidación por el hidroperóxido de la enzima que originalmente se encuentra reducida y posteriormente la reducción gracias al GSH de la enzima que había sido oxidada (Figura 14). La catálisis no cumple con la hipótesis de Michaelis–Menten, en la que la disminución del complejo enzima-sustrato es el paso limitante que lleva a una cinética de saturación (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013; Toppo y col, 2009). Si no que la cinética de GPx1 *in vitro* es mejor descrita como una secuencia de dos reacciones bimoleculares que, tal como sucede comúnmente en la química no catalizada, alcanza teóricamente velocidades infinitas en concentraciones infinitas de los participantes de la reacción (Toppo y col, 2009), por lo tanto aunque presenta dos constantes de velocidad, la Km global en la GPx de los mamíferos es infinita (Toppo y col, 2009; Takebe y col, 2002); sin embargo, dado que las concentraciones de GSH son del orden de micromolar *in vivo* y que las concentraciones de hidroperóxido usualmente son inferiores a este rango, la enzima es casi completamente reducida a velocidad independiente de la concentración del GSH (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

Esto significa que los cambios pequeños en la concentración de GSH como los que se han encontrado en muchos estudios, no tienen influencia en la velocidad con la que el hidroperóxido es removido por las GPx. Para afectar la actividad de la GPx estos cambios deben ser mucho más substanciales y disminuir la cinética hasta un orden menos de magnitud (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

Básicamente, la oxidación del tiolato o selenato por los hidroperóxidos es una reacción de desplazamiento nucleofílico (Toppo y col, 2009). Las GPx con centro

activo con Selenio y un residuo de cisteína (Sec), catalizan la reacción a una velocidad mucho mayor que las GPx cuyo centro activo tiene solo el residuo de cisteína; la explicación de este hecho reside en el papel del grupo amino, del que es asumido que facilita la oxidación del selenio por el hidropéroxido (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). No se ha observado inhibición de la GPx por el producto formado GSSG (Toppo y col, 2009).

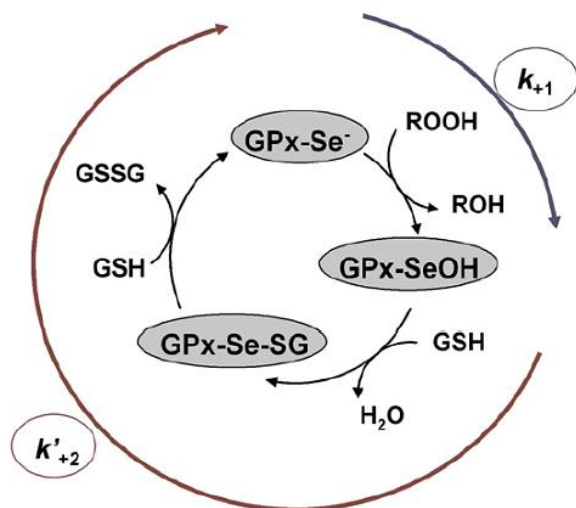


Figura 14. Ciclo catalítico de Glutatión peroxidasa. El ciclo catalítico sucede en dos pasos independientes: oxidación de la enzima por el hidropéroxido y posterior reducción de la misma gracias al GSH. Tomado de Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013

5.8 L-NAME: inhibidor de la producción de óxido nítrico

Como se ha descrito anteriormente uno de los factores iniciadores del estrés oxidativo durante el proceso isquémico cerebral es la producción de NO que desencadena parte de los mecanismos de daño celular. Por este motivo ha tomado gran relevancia en la investigación.

Una de las estrategias neuroprotectoras que se han desarrollado consiste en minimizar la producción de óxido nítrico en el proceso isquémico cerebral mediante el uso de inhibidores con el fin de prevenir sus efectos tóxicos. El NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Figura 15) ha sido identificado como un potente inhibidor de la síntesis de óxido nítrico endotelial y neuronal por ser un análogo de la arginina y llevar a cabo una inhibición competitiva en la enzima sintasa de óxido nítrico. Este

inhibidor evita la biosíntesis de óxido nítrico que es catalizada por las tres isoformas de enzimas sintasas del óxido nítrico (NOS): sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS o tipo I), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS o tipo III) y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS o tipo II) (Awooda y col, 2013).

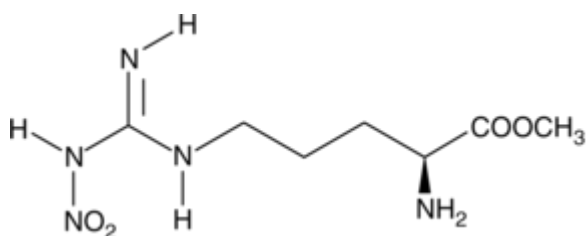


Figura 15. Estructura química del L-NAME. Inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico por ser análogo de la arginina. Tomado de Awooda y col, 2013

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material, métodos, referencias y equipo

Material de vidrio y reactivos grado analítico los necesarios para cada determinación.

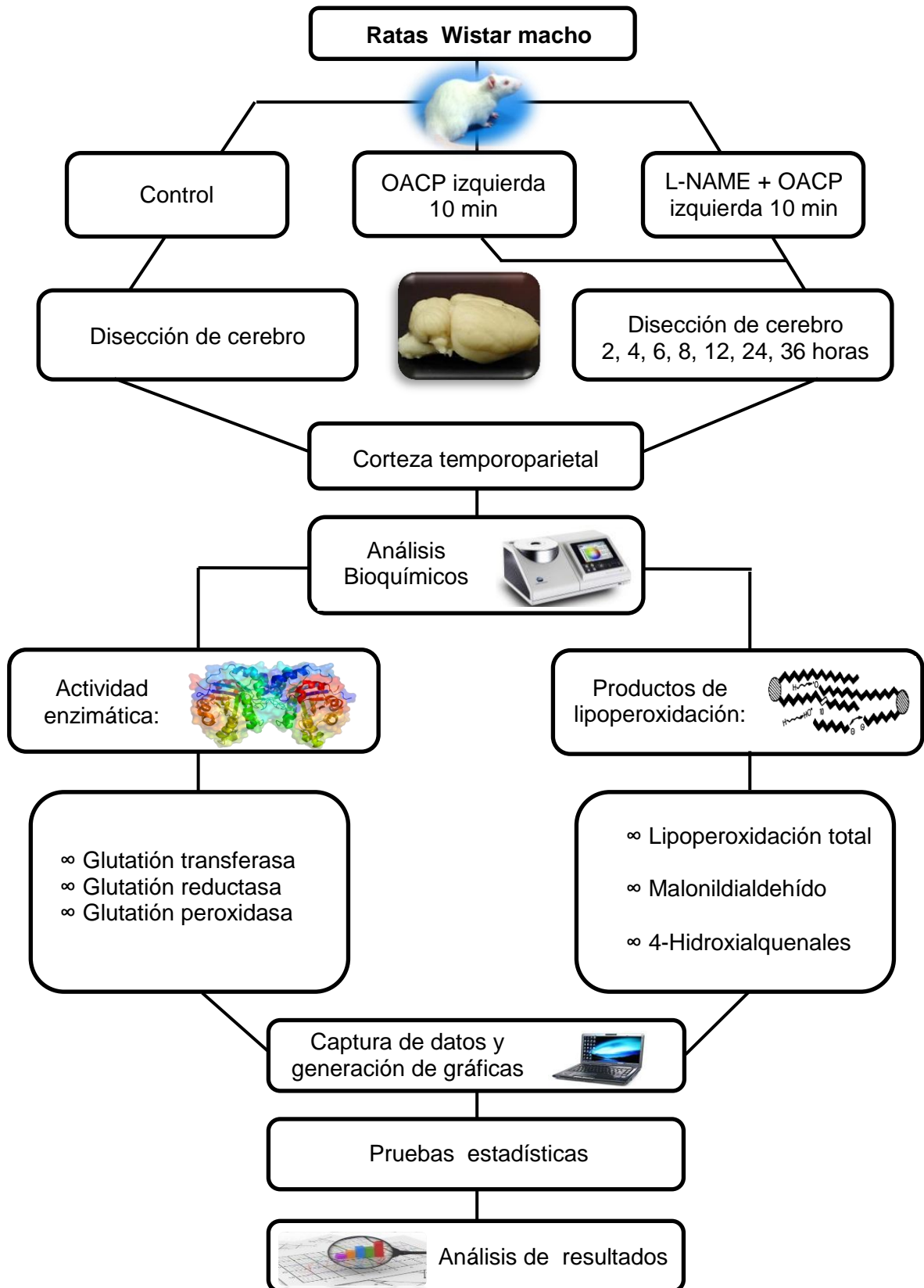
Tabla 8. Métodos y referencias

Determinación	Técnica	Método	Referencia
Actividad de Glutación transferasa	Cinética	Espectrofotométrico	Bompart y col, 1990
Actividad de Glutación reductasa	Cinética	Espectrofotométrico	Bompart y col, 1990
Actividad de Glutación peroxidasa	Cinética	Espectrofotométrico	Bompart y col, 1990
Productos de Lipoperoxidación	1-Metil-2-fenilindol con ácido metanosulfónico	Espectrofotométrico	Monnier y col, 1998
Malonildialdehído	1-Metil-2-fenilindol con ácido clorhídrico.	Espectrofotométrico	Monnier y col, 1998
4-Hidroxiálquenos	Cálculos matemáticos	Matemático	Monnier y col, 1998

Tabla 9. Equipo

Aparato	Modelo	Marca
Espectrofotómetro atemperado	RA 60	Bayer
Espectrofotómetro	Lambda EZ 150	Perkin Elmer
Microcentrífuga refrigerada	2216MK	Hermle
Balanza Analítica	XT 220 A	Precisa
Homogenizador	Tissue Tearable	Biospec products inc.
Vórtex	37 600 Mixer	Thermolyne
Ultracongelador	716	Thermo Forma
Refrigerador	FRT144AW	Vendo

6.2 Diagrama de trabajo



7. METODOLOGÍA

7.1 Biomodelo de estudio

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con peso de 190-230 g que se obtuvieron del Bioterio Claude Bernard de la BUAP, mantenidas bajo condiciones controladas con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y temperatura de 25°C, con acceso de agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales. En los experimentos se hizo todo el esfuerzo posible para minimizar el sufrimiento de los animales. La técnica quirúrgica y la extracción de cerebro se realizó como se describe en Aguilar-Alonso y col, 2008.

Se trabajó con tres grupos:

- El grupo control o tiempo cero: ratas sin ningún tipo de procedimiento quirúrgico mantenidas bajo condiciones de Bioterio hasta el momento de la disección del cerebro y obtención de la corteza temporoparietal con una n de 3.
- El grupo Isquemia o Isq: ratas a las que se les realizó cirugía de obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) izquierda durante 10 minutos y posterior reperusión del flujo sanguíneo en dicha arteria. Se llevó a cabo la disección del cerebro y la obtención de la corteza temporoparietal siguiendo el proceso desde un tiempo de 2 horas y después a las 4, 6, 8, 12, 24 y 36 horas post-reperusión, con una n de 3 para cada tiempo evaluado.
- El grupo L-NAME + Isquemia o Isq + L-NAME: ratas a las que se les administró el inhibidor de la producción de óxido nítrico L-NAME vía intraperitoneal, una hora antes de la OACP; posteriormente se realizó la cirugía y el seguimiento del daño de la misma forma que en el grupo de Isquemia con una n de 3 para cada tiempo evaluado.

Una vez obtenida la corteza temporoparietal de cada una de las ratas del experimento, se procedió a la preparación de las muestras para las determinaciones

bioquímicas correspondientes. Para esto se realizó el homogenado de las mismas en Buffer de fosfatos 50mM frío en proporción 1:3 con respecto al tejido y posteriormente se congeló a -70 °C hasta el momento de su análisis.

7.2 Análisis bioquímicos

Se evaluó la actividad enzimática de Glutación transferasa, Glutación reductasa y Glutación peroxidasa; así como la concentración de productos de lipoperoxidación total, malonildialdehído y 4-hidroxi-alquenos, como se resume a continuación y describe a detalle en el anexo A.

7.2.1 Determinación de actividad de Glutación transferasa

Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50mM, posteriormente se centrifugó manteniendo la cadena de frío. Se tomaron 25µL de sobrenadante, se adicionaron 912.5µL del Reactivo 1, 50µL del reactivo 2 y 12.5µL del reactivo 3, para obtener un volumen de reacción de 1 mL. Se obtuvo la $\Delta Abs/min$ monitoreando por 5 minutos la reacción en un espectrofotómetro a 37 °C y 405nm, tanto de la muestra como del blanco de reactivo.

Cálculos:

$$Actividad\ de\ GST\ \left(\frac{U}{mL}\right) = (\Delta Abs\ muestra - \Delta Abs\ blanco) Factor$$

El factor se obtuvo de acuerdo a la Ley de Lambert Beer y a las diluciones de la reacción y el homogenado.

7.2.2 Determinación de actividad de Glutación reductasa

Se homogenizó el tejido en buffer de fosfatos 50mM, posteriormente se centrifugó manteniendo la cadena de frío, y se realizaron los siguientes pasos:

Paso A: Se adicionaron 440µL del reactivo principal + 60µL del buffer regulador + 40µL de muestra + 20µL de FAD 315 µM. Se determinó la Δ Abs/min durante 3 minutos en un espectrofotómetro atemperado a 340nm **(A)**.

Paso B: Se añadieron 20µL del buffer regulador + 60µL de GSSG. Se determinó la Δ Abs/min durante 3 minutos en un espectrofotómetro a 37 °C y 340nm **(B)**.

Cálculos:

$$\text{Actividad de Glutación reductasa (U/mL)} = (B-A) \times \text{Factor}$$

El factor se obtuvo de acuerdo a la Ley de Lambert Beer y a las diluciones de la reacción y el homogenado.

7.2.3 Determinación de actividad de Glutación peroxidasa

Se homogenizó la muestra al 10% en frío en buffer de sucrosa. Se centrifugó conservando la cadena de frío. Para la reacción se tomaron 100µL de muestra y 875µL de reactivo de acoplamiento. Se incubaron 3 minutos a 37°C. Se adicionaron 25µL de sustrato de hidroperóxido. Se determinó la Δ Abs/minuto durante 2 minutos a 340nm en un espectrofotómetro a 37 °C.

Cálculos:

$$\text{Actividad de GPx (U/mL)} = \Delta\text{Abs/minuto} \times \text{Factor}$$

El factor se obtuvo de acuerdo a la Ley de Lambert Beer y a las diluciones de la reacción y el homogenado

7.2.4 Determinación de productos de lipoperoxidación total (Malonildialdehído + 4-Hidroxiacuales)

Se añadieron en un tubo de ensaye 650µL de la solución I diluida, 200µL de la muestra y se colocó en vibroagitador durante 3-4 segundos. Se adicionaron 150µL

de ácido metanosulfónico, se mezcló vigorosamente, se taparon los tubos, se incubaron a 45 °C durante 40 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3000rpm. Se leyó la absorbancia a 586nm contra un blanco de reactivo.

7.2.5 Malonildialdehído

Se añadieron en un tubo de ensaye 650 μ L de la solución I diluida, 200 μ L de la muestra y se colocaron en vibroagitador durante 3-4 segundos. Se adicionaron 150 μ L de ácido clorhídrico, se mezcló vigorosamente, se taparon los tubos, se incubaron a 45°C durante 60 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron durante 15 minutos a 3000rpm. Se leyó la absorbancia a 586nm contra un blanco de reactivo. La concentración en la muestra se obtuvo mediante una curva de calibración usando el estándar correspondiente para cada determinación.

7.2.6 4-Hidroxiálquenos

La concentración de 4-Hidroxiálquenos se calculó como la diferencia entre la concentración obtenida utilizando ácido metanosulfónico menos la concentración obtenida utilizando ácido clorhídrico.

Se capturaron los datos, se generaron las gráficas y se procedió a su análisis estadístico.

7.3 Análisis Estadístico

Se utilizó Anova de una vía y Dunet como prueba pos-test para evaluar diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Isquemia y el grupo Isq + L- NAME fueron evaluadas con una *t* de student de un solo tallo. Para ambas pruebas se consideró un nivel de significancia con $p < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El proceso isquémico cerebral es un evento que puede presentarse en todos los ámbitos de la sociedad y causante de afecciones graves en los pacientes que van desde pequeñas molestias hasta incluso ocasionar la muerte dependiendo de la gravedad de este evento; siendo el estrés oxidativo generado uno de los principales mecanismos de daño a la unidad neurovascular, por lo que resulta importante el estudio de los sistemas antioxidantes como el glutatión, que se activan en respuesta a estas condiciones para promover la sobrevivencia celular.

En resultados reportados por Guzmán-López en el 2011 se encontró que los niveles de glutatión total y reducido incrementan desde las dos horas post-reperusión, pero que cuando se analizan a las 24 horas post-reperusión, ambos se encuentran por debajo de los valores normales y aunque se esperaba encontrar elevados los niveles de glutatión oxidado esto no fue así, por lo que se decidió analizar a las enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión.

Las enzimas estudiadas en este trabajo forman parte del mecanismo por el cual el sistema antioxidante mediado por glutatión permite disminuir las especies reactivas tanto de nitrógeno como las de oxígeno para coadyuvar a la sobrevivencia celular, mecanismo que de ser rebasado conduce a la muerte celular.

8.1 Actividad de Glutatión transferasa

La Glutatión transferasa (GST) es una enzima que participa directamente en la detoxificación celular a través del sistema glutatión, por lo que la variación en su actividad influye de manera directa en la concentración del mismo. En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos en el experimento.

Actividad de Glutacion Transferasa

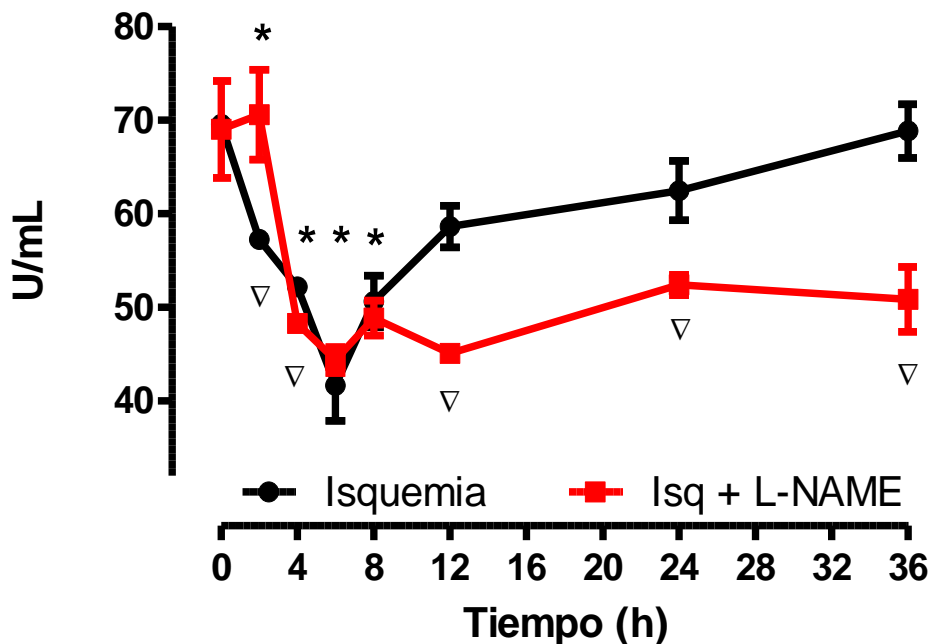


Figura 16. Curva temporal de la actividad catalítica de Glutación transferasa durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperfusión, prueba estadística: t de Student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media.

En la gráfica se observa que durante la OACP, la actividad catalítica de la enzima Glutación Transferasa sufre una disminución significativa de 17.61 ± 0.4 % con respecto al grupo control desde las 2 horas; presentando un mínimo de actividad a las 6 horas post-reperfusión tiempo en el cual la disminución con respecto al grupo control es de 40.33 ± 9.29 %, recuperándose a las 36 horas post-reperfusión llegando prácticamente a niveles basales ya que no presenta diferencia significativa con respecto al grupo control (grupo control no presentado en la gráfica).

Con la administración de L-NAME antes de la OACP se observa un comportamiento similar en cuanto a los tiempos en que se presentan los cambios en la actividad de Glutación Transferasa; sin embargo la actividad enzimática se mantiene por debajo de la presentada en el grupo Isquemia cuando se compara con este, presentando disminuciones estadísticamente significativas de $6.67 \pm 1.54\%$, $22.23 \pm 3.83 \%$, $15.24 \pm 5.36 \%$ y $25.59 \pm 4.08 \%$ a las 4, 12, 24 horas y 36 horas post-reperusión, respectivamente.

Otra diferencia importante y significativa que se observa en el grupo de L-NAME es el aumento de actividad de Glutación Transferasa de un $24.26 \pm 0.41 \%$ a las 2 horas post-reperusión también con respecto al grupo isquemia.

8.2 Actividad de Glutación reductasa

La enzima Glutación Reductasa se encarga de regresar el glutati3n oxidado (GSSG) a glutati3n reducido (GSH), el cual vuelve a cumplir su funci3n como antioxidante end3geno, por lo que la actividad de esta enzima se encuentra involucrada de manera directa en la proporci3n de GSH respecto al GSSG en procesos de estr3s oxidativo como la isquemia cerebral, es por esto que se evalu3 su actividad en el modelo de la OACP izquierda.

En la Figura 17 se observa que durante la OACP la actividad de la enzima Glutati3n Reductasa presenta un incremento significativo del $21.10 \pm 0.99 \%$ a las 2 horas post-reperusi3n, el cual se mantiene hasta las 6 horas en que el incremento es de $22.10 \pm 0.72 \%$ con respecto al grupo control; para despu3s empezar a disminuir hasta las 24 horas en que sufre una ca3da del $32.78 \pm 4.31 \%$ con respecto al grupo control y regresar a niveles basales a las 36 horas en las que no muestra diferencia significativa respecto al grupo control (grupo control no presentado en la gr3fica).

En el grupo al que se le administr3 L-NAME antes de la OACP, el comportamiento de la actividad de la enzima Glutati3n Reductasa es opuesto al grupo Isquemia en las

primeras 8 horas, presentando una disminución a partir de las 2 horas post-reperfusion del 24.88 ± 0.99 % con respecto al grupo Isquemia; para llegar a su mínimo de actividad a las 6 horas post-reperfusion con una disminución del 53.71 ± 0.72 % respecto al grupo Isquemia. Posteriormente se comporta de manera muy similar al grupo Isquemia en la etapa tardía del proceso isquémico (de 12 a 36 horas post-reperfusion).

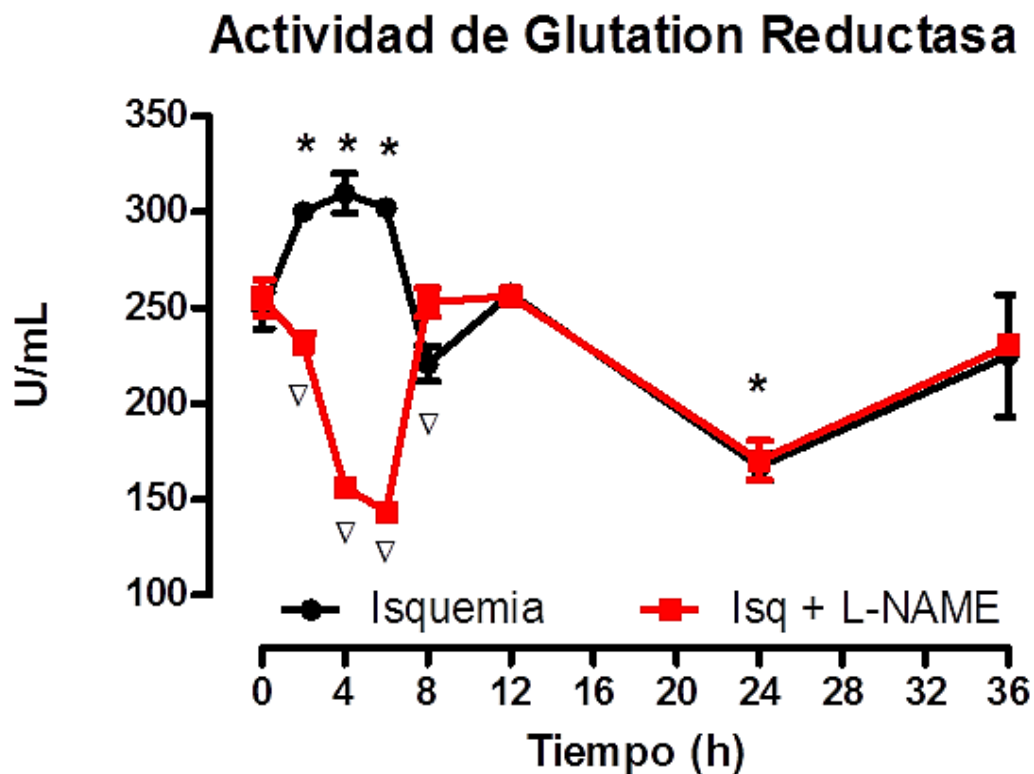


Figura 17. Curva temporal de actividad catalítica de Glutación reductasa durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperfusion, prueba estadística: t de Student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media

8.3 Actividad de Glutación peroxidasa

Durante el proceso isquémico cerebral se producen diversos compuestos nocivos para las células, entre ellos los radicales libres; que si no son contrarrestados pueden generar daños importantes a nivel celular que van desde la desestabilización de la membrana citoplasmática por la lipoperoxidación causada, nitración de proteínas en distintos organelos celulares, hasta el daño directo al ADN.

Ante estos fenómenos patológicos se activan los antioxidantes endógenos como el sistema glutación el cual se encarga entre otras cosas de la detoxificación celular ante el estrés oxidativo, por medio de la participación de enzimas como la Glutación Peroxidasa (GPx) que es la encargada de catalizar la reacción en la que el glutación reducido (GSH) funciona como donador de protones a los radicales libres al mismo tiempo que se oxida contribuyendo a disminuir el estrés oxidativo en el medio (Deponte, 2013), es por eso que en este experimento se evaluó la actividad de la GPx en el modelo de la OACP.

En la Figura 18 se observa que durante la OACP la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa presenta un incremento significativo de 44.3 ± 7.27 % con respecto al grupo control (grupo control no presentado en la gráfica) a las 8 horas post-reperfusion, posteriormente disminuye a las 12 horas y vuelve a aumentar presentando su máximo de actividad a las 24 horas post-reperfusion con un incremento del 141.3 ± 4.35 % con respecto al grupo control; regresando a niveles basales a las 36 horas post-reperfusion (grupo control no presentado en la gráfica).

La administración de L-NAME evita la actividad máxima observada en el grupo Isquemia a las 24 horas post-reperfusion, por el contrario, con su administración se observó una disminución significativa del 35.35 ± 4.35 % con respecto al grupo isquemia evaluado en este mismo tiempo post-reperfusion.

Actividad Glutacion Peroxidasa

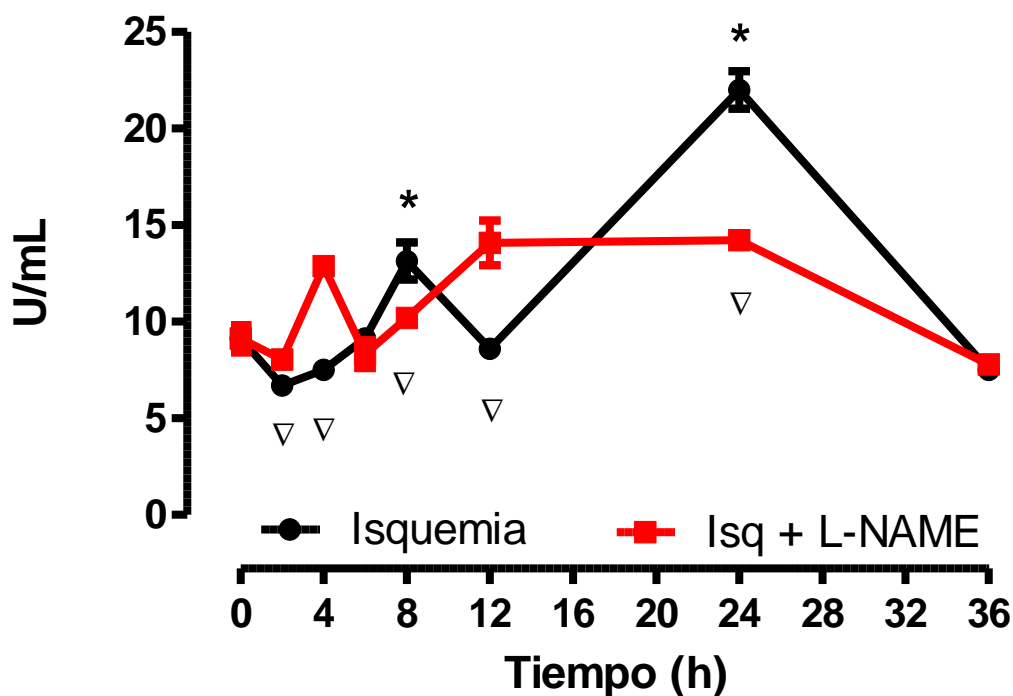


Figura 18. Curva temporal de actividad catalítica de Glutación peroxidasa durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperusión, prueba estadística: t de Student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media

Hasta este punto el análisis de las actividades enzimáticas muestra que en las primeras 8 horas se incrementa la actividad de la Glutación reductasa y la Glutación Peroxidasa, siendo reflejo del aumento de especies oxidantes en el medio formadas dentro del mecanismo de daño en respuesta al proceso isquémico cerebral.

Por otra parte, la Glutación transferasa presenta una disminución de su actividad respecto al control en este mismo periodo de tiempo, descartándose la posibilidad de

que pueda ser regulada por el incremento de NO, ya que cuando el NO• no se encuentra presente en el medio (como en el grupo con la presencia del L-NAME), se observa la inhibición de esta enzima a las mismas horas con la misma intensidad.

En la etapa tardía post-reperusión la actividad de la Glutación Reductasa disminuye considerablemente y la actividad de la Glutación transferasa incrementa, al mismo tiempo que incrementa la actividad de Glutación peroxidasa, alcanzando su máximo en el tiempo estudiado a las 24 horas post-reperfusion, por lo que se esperaría que la Glutación reductasa también incrementara dado que la Glutación peroxidasa le suministra el sustrato para que funcione; sin embargo el incremento de la Glutación transferasa explicaría el hecho de que la Glutación reductasa disminuya, ya que si la Glutación transferasa se mantiene activa, el glutati6n oxidado es expulsado de la c6lula disminuyendo su concentraci6n en el medio, motivo por el cual la Glutati6n reductasa ya no tiene sustrato y en consecuencia disminuye su actividad; como ha sido sugerido debido al mecanismo de acci6n de “pin-pong” de esta enzima, en el que al faltar uno de sus sustratos disminuye su actividad. (Deponte, 2013).

Con respecto al grupo Isq + L-NAME, se observa que en general la actividad de las tres enzimas se mantiene por debajo de los niveles del grupo isquemia, esto podr3a deberse a que al inhibir la producci6n de 6xido n3trico no se genera el mismo estr3s oxidativo que en el proceso isqu3mico, por lo que el sistema antioxidante glutati6n no se activa con la misma intensidad, concordando con lo reportado en estudios previos en los que se ha comprobado que la administraci6n de L-NAME previo a la OACP disminuye el estr3s oxidativo y el da1o cerebral, lo que se ha comprobado con la aplicaci6n de pruebas f3sicas y estudios bioqu3micos en los biomodelos (Awooda y col, 2013), este hecho sugiere que el 6xido n3trico podr3a estar involucrado en la regulaci6n de algunas de las enzimas del sistema glutati6n o bien que la actividad de las enzimas evaluadas est3 sujeta a regulaci6n positiva por el aumento de la concentraci6n de su respectivo sustrato en el medio, tal y como sucede con la Glutati6n peroxidasa seg6n lo reportado por Brigelius-Floh3 y Maiorino, 2013, y con

la Glutación reductasa, como ya se ha mencionado (Deonte,2013), aunque para la Glutación transferasa no se ha reportado hasta el momento.

8.4 Lipoperoxidación total

Cuando las especies reactivas no son consumidas por los sistemas antioxidantes como el glutatión, inducen procesos nocivos para las células como lipoperoxidación que implica la conversión de ácidos grasos poliinsaturados en aldehídos altamente reactivos (Aoyama y col, 2008). En este experimento se midió como se encuentran los productos de lipoperoxidación total, representados por sus principales componentes: malonidialdehído y 4-Hidroxi-alquenos en el proceso isquémico cerebral en rata a diferentes horas post-reperfusión en el modelo de la OACP izquierda.

En la Figura 19 se observa que en el proceso isquemia-reperfusión por medio de la OACP, se presenta una producción exacerbada de los productos de lipoperoxidación total, presentando diferencias significativas respecto al control en todos los tiempos post-reperfusión con un incremento del $125.7 \pm 1.66\%$, $114.0 \pm 3.82\%$, $197.0 \pm 2.94\%$, $150.7 \pm 2.67 \%$, $107.0 \pm 2.28 \%$, $241.70 \pm 4.42 \%$ y $182.3 \pm 4.14 \%$ a las 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 36 horas post-reperfusión respectivamente, presentándose el mayor incremento a las 24 horas post-reperfusión (grupo control no presentado en la gráfica). Estos eventos se previenen con la administración previa a la OACP del inhibidor de la producción de óxido nítrico, presentando diferencias significativas con respecto al grupo isquemia con una disminución de los productos de lipoperoxidación total en el grupo Isq + L-NAME del $75.93 \pm 1.66 \%$, $53.58 \pm 3.82 \%$, $61.95 \pm 2.94 \%$, $51.62 \pm 2.67 \%$, $55.39 \pm 2.28 \%$, $78.44 \pm 4.42 \%$ y $69.42 \pm 4.14 \%$ a las 2,4,6,8,12,24 y 36 horas post-reperfusión respectivamente, presentándose la disminución más pronunciada a las 24 horas post-reperfusión.

Lipoperoxidación total

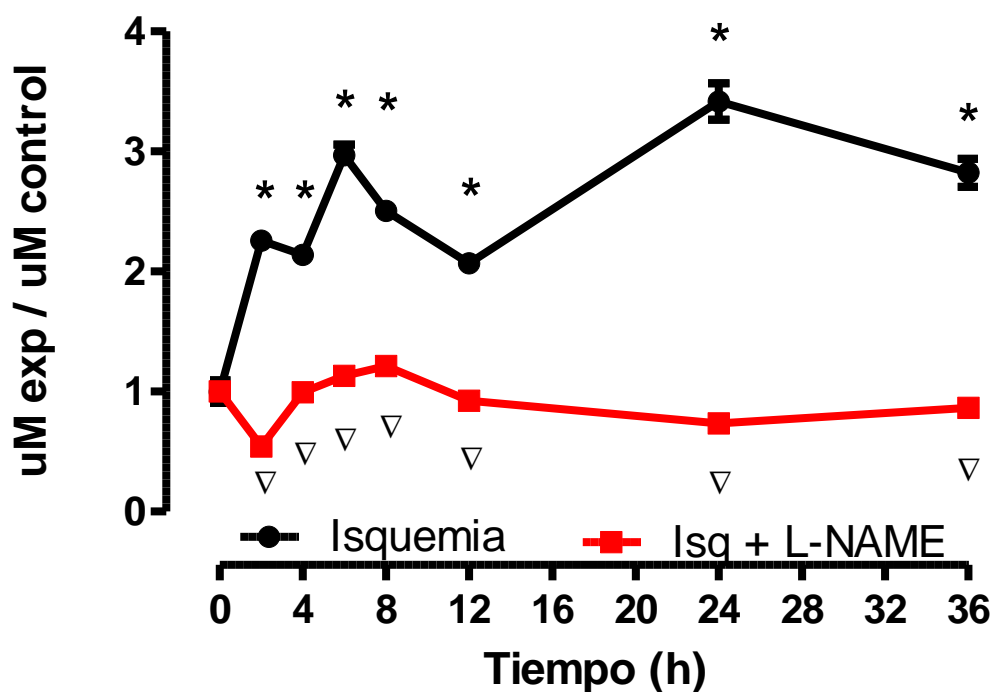


Figura 19. Curva temporal de lipoperoxidación total durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperusión, prueba estadística: t de Student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media

8.5 Malonildialdehído

En condiciones de estrés oxidativo como es el caso de la isquemia cerebral, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno pueden atacar a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados y dar lugar a la formación de aldehídos reactivos tal es el caso del malonildialdehído que a su vez puede generar deterioro oxidativo a diferentes compuestos celulares causando citotoxicidad. En este experimento se determinó cuantitativamente la presencia de malonildialdehído a diferentes tiempos

post-reperfusión en el modelo de la OACP izquierda en rata. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos.

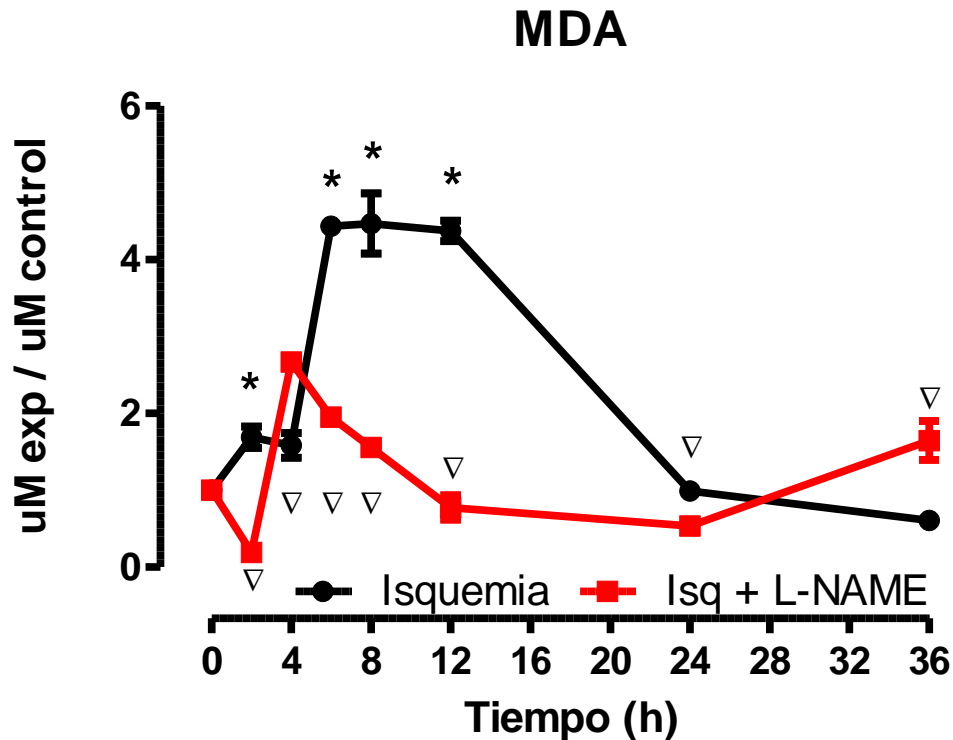


Figura 20. Curva temporal de Malonildialdehído (MDA) durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperfusión, prueba estadística: t de Student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media

En la Figura 20 se observa que en la etapa temprana del proceso isquemia-reperfusión en el modelo de la OACP izquierda en rata, se presenta un incremento de malonildialdehído significativo respecto al control de un $68.0 \pm 8.22 \%$, $343.7 \pm 1.48 \%$, $347.0 \pm 8.76 \%$ y $337.70 \pm 3.05 \%$ a las 2, 6, 8 y 12 horas post-reperfusión, respectivamente, posteriormente el malonildialdehído disminuye prácticamente a

niveles basales a las 24 y 36 horas, donde no se encuentra diferencia significativa respecto al control (grupo control no presentado en la gráfica). En el grupo al que se le administró previamente a la OACP el inhibidor de la producción de óxido nítrico L-NAME se presenta un incremento de malonildialdehído con respecto al control, pero una disminución significativa del mismo con respecto al grupo isquemia a las 2, 6, 8, 12, 24 y 36 horas, siendo de un $88.58 \pm 8.22 \%$, $55.98 \pm 1.48 \%$, $65.10 \pm 8.76 \%$, $82.25 \pm 3.05 \%$, $45.79 \pm 12.05 \%$ y $171.96 \pm 6.19 \%$, respectivamente. Mientras que a las 4 horas post-reperfusión se presenta un incremento del $68.05 \pm 10.01 \%$ en la concentración de malonildialdehído en el grupo Isq+ L-NAME con respecto al grupo isquemia.

8.6 4-Hidroxiálquenos

Los 4-Hidroxiálquenos son los productos de lipoperoxidación que se producen en mayor abundancia bajo condiciones de estrés oxidativo como en la isquemia cerebral con perfusión generada en este trabajo a partir del modelo de la obliteración de la arteria carótida primitiva (OACP) izquierda en rata. Estos compuestos son altamente reactivos debido a que en su estructura química presentan grupos funcionales que fácilmente pueden atacar a compuestos biológicos, por lo que se les considera como causantes de estrés oxidativo y toxicidad celular (Barrera, 2012).

En la Figura 21 se observa que las concentraciones de 4-Hidroxiálquenos presentan diferencias significativas respecto al control conforme transcurre el tiempo post-reperfusión, encontrando un incremento desde las 2 horas de $176.7 \pm 6.41 \%$, pasando por las 4 y 6 horas con un incremento de $164.7 \pm 11.4 \%$ y $64.0 \pm 13.79 \%$, respectivamente, presentándose el mayor incremento de concentración de 4-Hidroxiálquenos de $461.7 \pm 6.99 \%$ respecto al control a las 24 horas post-reperfusión, finalizando con un incremento del $383.3 \pm 3.97 \%$ respecto al control a las 36 horas post-reperfusión (grupo control no presentado en la gráfica). Por otra parte, en este mismo grupo de OACP se presenta una disminución significativa respecto al control del $64.33 \pm 0.93 \%$ a las 12 horas post-reperfusión. La

administración intraperitoneal del inhibidor de la producción de óxido nítrico antes de la OACP previene estos eventos, presentando este grupo una disminución significativa respecto al grupo isquemia del $78.32 \pm 6.41 \%$, $72.80 \pm 11.40 \%$, $39.63 \pm 13.79 \%$, $86.29 \pm 6.99 \%$ y $84.83 \pm 3.97 \%$ a las 2, 4, 6, 24 y 36 horas post-reperfusión, respectivamente, sin presentarse diferencias significativas a las 8 horas post-reperfusión y con un aumento significativo en el grupo de Isq+ L-NAME del $165.41 \pm 0.93 \%$ con respecto al grupo isquemia a las 12 horas post-reperfusión.

4-Hidroxiálquenos

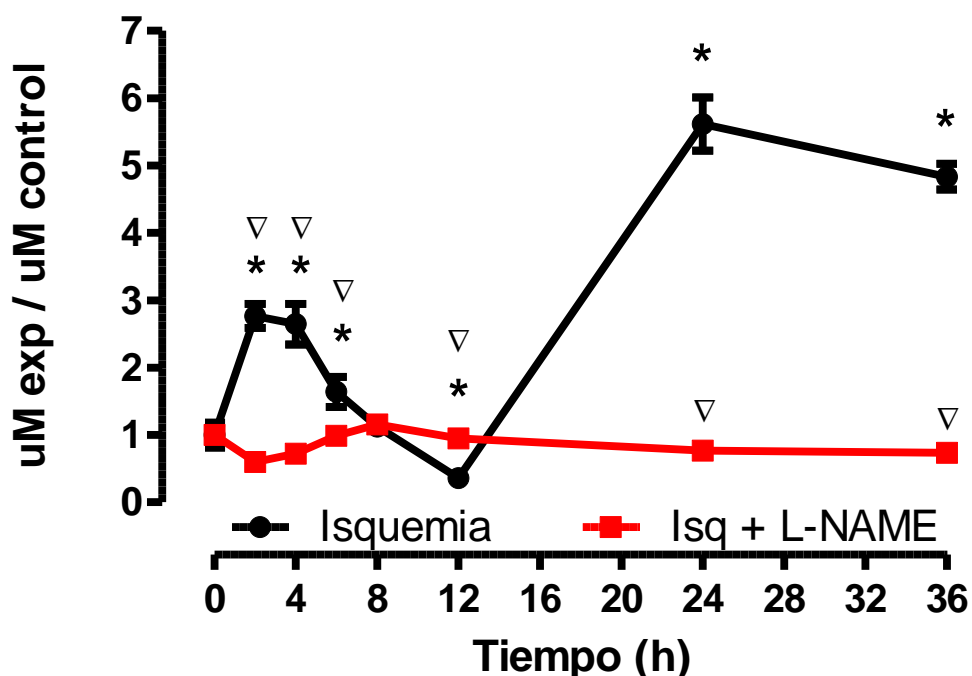


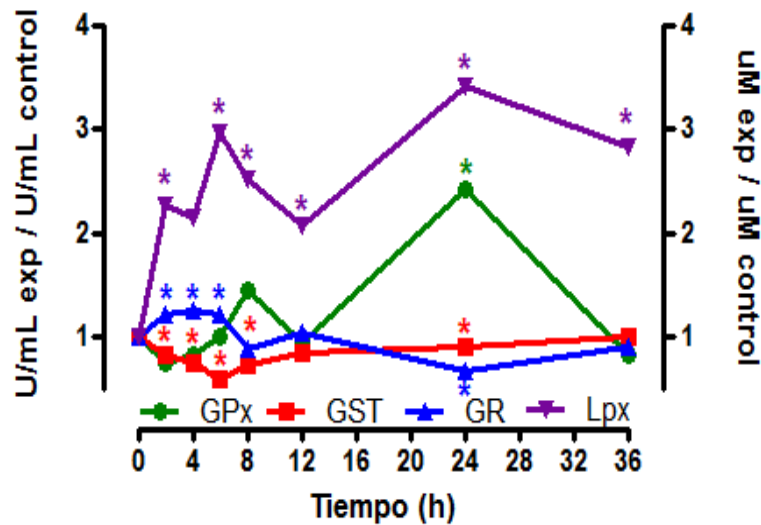
Figura 21. Curva temporal de 4-Hidroxiálquenos durante un proceso isquémico cerebral en rata. ● grupo con OACP izquierda; ■ grupo con administración intraperitoneal de L-NAME antes de la OACP. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control utilizando ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas; ▽ Diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos evaluados al mismo tiempo post-reperfusión, prueba estadística: t de student de un solo tallo $p < 0.05$. Se muestra el error estándar de la media

Desde las primeras 8 horas post-reperfusión se observa un incremento en la lipoperoxidación total (Figura 19), lo que podría estar ocasionando la disminución de actividad de la Glutación transferasa (Figura 16) ya que al tratarse de una proteína, también es susceptible al deterioro oxidativo causado por los productos de lipoperoxidación, particularmente el malonildialdehído, ya que como observa en la Figura 20, en esta primera etapa presenta un aumento en su concentración aún en ausencia de óxido nítrico, indicando que se puede estar formando por otras vías independientes del mismo, por ejemplo por reacciones entre el radical superóxido o el radical hidroxilo con los dobles enlaces de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados; a diferencia de los 4-Hidroxialquenos que como se observa en la Figura 22, su producción aumenta solo en presencia de óxido nítrico, coincidiendo el pico de su mayor concentración a las 24 horas post-reperfusión con el segundo pico de producción de óxido nítrico también a las 24 horas post-reperfusión reportado por Guzmán-López en el 2011.

8.7 Comparación entre la actividad de las diferentes enzimas responsables del metabolismo de Glutación y la lipoperoxidación total en el grupo Isquemia

En respuesta a condiciones extremas de estrés oxidativo como es el caso de la isquemia cerebral, se activan como mecanismo de defensa para la detoxificación celular sistemas antioxidantes endógenos como el glutatión y las enzimas asociadas a él. Una de estas enzimas es la Glutación peroxidasa (GPx) que se encarga de catalizar la reacción entre el glutatión reducido y los radicales libres u otros compuestos causantes de estrés oxidativo para contribuir a mantener la homeostasis celular. En la Figura 22 se muestra cómo se encuentra la actividad de las enzimas asociadas al sistema glutatión que se estudiaron en comparación con la variación en la concentración de los productos de lipoperoxidación total a diferentes tiempos post-reperfusión en el modelo de isquemia cerebral por medio de la OACP izquierda en rata.

A) Lipoperoxidación total, Actividad de GPx GST y GR en isquemia



B) Actividad de GPx y Lipoperoxidación en Isquemia

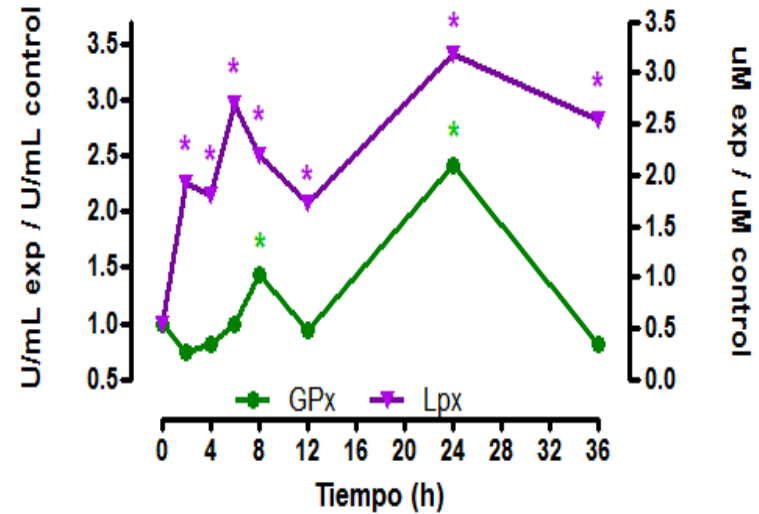


Figura 22. Curva temporal de actividad catalítica de las enzimas asociadas al sistema glutatión y lipoperoxidación total durante un proceso isquémico cerebral en rata. A) Curva temporal de actividad catalítica de Glutati6n peroxidasa, Glutati6n transferasa, Glutati6n reductasa y Lipoperoxidaci6n total durante un proceso isqu6mico cerebral en rata B) Curva temporal de actividad catalítica de Glutati6n peroxidasa y Lipoperoxidaci6n total durante un proceso isqu6mico cerebral en rata. ■ Actividad catalítica de Glutati6n transferasa (GST) en el grupo OACP izquierda; ▲ Actividad catalítica de Glutati6n reductasa (GR) en el grupo OACP izquierda; ■ Actividad catalítica de Glutati6n peroxidasa (GPx) en el grupo con OACP izquierda; ▼ Lipoperoxidaci6n total (Lpx) en el grupo con OACP izquierda. * Diferencia estadística significativamente respecto al control en GST; * Diferencia estadística significativamente respecto al control en GR; * Diferencia estadística significativamente respecto al control en GPx; * Diferencia estadística significativamente respecto al control en lipoperoxidaci6n total. Se utilizaron ANOVA de una vía y Dunnett como pruebas estadísticas $p < 0.05$.

En la figura 22 A) se observan los cambios que presenta la actividad catalítica de las enzimas asociadas al sistema glutatión así como el cambio en la lipoperoxidación total en el proceso estudiado; en la figura 22 B) se observa claramente como la actividad de la Glutatión peroxidasa se modifica conforme aumenta o disminuye la concentración de los productos de lipoperoxidación en la mayoría de las etapas del proceso de isquemia-reperfusión estudiado, indicando que esta enzima se está activando y cumpliendo su función en la protección celular y que además lo hace con una rápida respuesta tal y como se esperaba al ser una selenoproteína de acción rápida; aumentando su actividad cuando aumentan las especies oxidantes (en este caso productos de lipoperoxidación) y disminuyéndola rápidamente cuando lo hacen también los productos de lipoperoxidación que en este caso son su sustrato, datos que coinciden con lo reportado por Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013, dado que a concentraciones fisiológicas, esta enzima no cumple con la cinética de Michaelis–Menten ni se comporta como un sistema saturable, sino que cuando aumenta la concentración de su sustrato aumenta también su actividad y viceversa, tal como se observa en este experimento.

Con los resultados de este experimento es posible sugerir una explicación probable acerca de los resultados obtenidos por Guzmán-López en el 2011, ya que en la etapa temprana post-reperfusión se encuentra un aumento del glutatión total y glutatión reducido que coinciden con el primer pico de producción de óxido nítrico a las 2 horas post-reperfusión, y también coinciden con el incremento de la Glutatión reductasa encontrado en este experimento a esta misma hora post-reperfusión, siendo que esta enzima está activada en este momento reduciendo el glutatión que se pueda estar oxidando en el proceso y aunque la actividad de la Glutatión peroxidasa está disminuida podría ser que en ese momento el glutatión trabaje de manera no enzimática para la detoxificación celular. Posteriormente, en las etapas tardías post-reperfusión, cuando se reporta una disminución en el GSH y un aumento de mucho menor magnitud en el GSSG, se observa que esta disminución de GSH podría deberse a que está siendo utilizado para detoxificar a las células contra el daño oxidativo que se refleja en el aumento de la lipoperoxidación total la cual

presenta su mayor pico a las 24 horas post-reperfusión, principalmente a expensas de los 4-hidroxi-alquenosales tal y como puede apreciarse en la Figura 21. Estos eventos coinciden con el segundo pico de producción de óxido nítrico y la disminución de GSH, así como con el mayor pico de actividad de Glutatión peroxidasa que en este momento se encuentra activada para catalizar la reacción entre el GSH y las especies oxidantes producidas.

Así mismo, se ha reportado que el GSSG aumenta pero no en magnitud suficiente como para explicar la disminución del GSH (Guzmán-López, 2011), hecho que coincide con el aumento de actividad en esta misma hora de la Glutatión transferasa por la cual se conjuga al glutatión con especies oxidantes para la célula y su posterior expulsión por transportadores como RalBP-1 (Grimsrud y col, 2008). Además, la actividad de la Glutatión reductasa se encuentra disminuida por lo que el GSSG no está siendo reducido de manera eficiente, explicando el hecho de que la concentración de GSH decaiga de manera tan notoria, ya que la tasa de oxidación es mucho mayor a la de reducción en función de la actividad de las enzimas responsables de estas reacciones, ya que en este momento, a las 24 horas post-reperfusión, es cuando se requiere una mayor activación del sistema glutatión porque es el momento en que se encuentra también la más alta concentración de especies oxidantes, en este trabajo medidas como productos de lipoperoxidación, siendo los 4-hidroxi-alquenosales los que se encuentran en mayor concentración en esta etapa, mientras que el malonildialdehído disminuye.

La Glutatión peroxidasa tiene diversas funciones en la célula, se ha reportado que la GPx-1 protege contra estímulos inflamatorios que pueden promover estados proaterogénicos y fomentar carcinogénesis. Adicionalmente, la GPx-1 previene la mutagénesis del ADN disminuyendo de esta manera una posible carcinogénesis (Lubos y col, 2011).

9. CONCLUSIONES

En el proceso isquémico cerebral, generado en este trabajo con el modelo de obliteración de la arteria carótida primitiva, se producen una serie de eventos fisiopatológicos que llevan a la degeneración neuronal, en la cual es un factor muy importante de daño el estrés oxidativo causado en parte por el aumento en la producción de óxido nítrico que lleva a la formación de otros radicales libres y especies oxidantes tóxicas. En respuesta a estos eventos nocivos se activan los sistemas antioxidantes endógenos, siendo el más significativo a nivel cerebral el sistema Glutación, en el cual participan enzimas cuya función es desintoxicar a la célula manteniendo el equilibrio redox.

Los resultados obtenidos muestran que en etapa temprana del proceso isquemia-reperfusión se incrementa la actividad de la Glutación reductasa y la Glutación peroxidasa en respuesta al aumento de especies oxidantes en el medio, lo que se refleja con la elevación de los productos de lipoperoxidación total en esta misma etapa. Sin embargo, la actividad catalítica de la Glutación transferasa presenta una disminución significativa, sin que se relacione con el incremento de NO, ya que cuando el NO• no se encuentra presente en el medio (como en el grupo con la presencia del L-NAME), se observa la inhibición de esta enzima a las mismas horas con la misma intensidad. Por otra parte, en la etapa tardía del proceso, la actividad de la Glutación reductasa disminuye considerablemente y la actividad de la Glutación transferasa incrementa, al mismo tiempo que incrementa la actividad de Glutación peroxidasa, lo cual coincide con lo esperado ya que si la Glutación transferasa se mantiene activa, el glutati6n oxidado es expulsado de la c6lula disminuyendo su concentraci6n en el medio, motivo por el cual la Glutati6n reductasa ya no tiene sustrato y en consecuencia disminuye su actividad, debido al mecanismo de acci6n de "pin-pong" de esta enzima, en el que al faltar uno de sus sustratos su actividad disminuye.

Con este experimento fue posible evaluar y conocer la actividad enzimática de Glutación transferasa, Glutación reductasa y Glutación peroxidasa en un proceso isquémico cerebral en rata en presencia y ausencia de L-NAME, así como la concentración de los productos de lipoperoxidación total y sus componentes principales: malonildialdehído y 4-Hidroxi-alquenos. De los resultados obtenidos se desprende que las enzimas del sistema Glutación evaluadas se encuentran trabajando en equilibrio a pesar del estrés oxidativo a que ellas mismas fueron sometidas después del proceso isquémico cerebral; y que ante este estímulo adverso la actividad enzimática del sistema Glutación varía en magnitud conforme es requerida su participación de acuerdo al grado de estrés oxidativo generado durante el proceso conforme transcurre el tiempo post- reperusión.

10. SUGERENCIAS

Evaluar la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de glutación para ver si los cambios en la concentración del mismo durante el proceso estudiado se deben también a la síntesis *de novo* de glutación además de a su ciclo de óxido-reducción.

Evaluar por medio de inmunoensayo u otro método cuantitativo a las enzimas estudiadas en este trabajo para apreciar la correlación entre su cantidad y su funcionalidad o actividad catalítica, ya que podría darse el caso de que la concentración enzimática se encuentre dentro del rango fisiológico normal, pero que dicha enzima no lleve a cabo su función de manera adecuada debido a las condiciones adversas presentes durante el proceso de isquemia-reperusión cerebral estudiado.

Evaluar de manera cuantitativa a otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, por ejemplo radical superóxido e hidroxilo, responsables de generar estrés oxidativo celular con el fin de determinar su contribución a la producción de lipoperoxidación cuando no es mediada por óxido nítrico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal A, Aggarwal P, Khatak M, Khatak S, "Cerebral ischemic stroke: sequels of cascade." *I J Pharma and Bio S*, 1, 3, (2010):1-24.
2. Aguilar-Alonso P, Martinez-Fong D, Pazos-Salazar NG, Brambila E, Gonzalez-Barrios JA, Mejorada A, Flores G, Millan-Perezpeña L, Rubio H, Leon-Chavez BA, "The increase in zinc levels and upregulation of zinc transporters are mediated by nitric oxide in the cerebral cortex after transient ischemia in the rat." *Brain Res*, 20, 1200, (2008):89-98.
3. Albrecht P, Lewerenz J, Dittmer S, Noack R, Maher P, Methner A, "Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target." *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 3, (2010):373-82.
4. Álvarez-Sabín J, Ribó M, Masjuan J, Tejada JR, Quintana M, "Hospital care of stroke patients: importance of expert neurological care." *Neurologia*. 26, 9, (2011):510-7.
5. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T, "Regulation of neuronal glutathione synthesis." *J Pharmacol Sci*, 108, 3, (2008):227-38.
6. Aoyama K, Nakaki T, "Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration." *Int J Mol Sci*, 14, 10, (2013):21021-44.
7. Aoyama K1, Nakaki T, "Inhibition of GTRAP3-18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis." *Int J Mol Sci*, 13, 9, (2012):12017-35.
8. Arai K, Lok J, Guo S, Hayakawa K, Xing C, Lo EH, "Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke." *J Child Neurol*, 26, 9, (2011):1193-8.
9. Arango-Davila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H, "Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice." *Rev Neurol*, 39, 2, (2004):156-65.
10. Atkinson HJ, Babbitt PC, "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." *Biochemistry*, 24, 48, 46, (2009):11108-16.
11. Awooda HA, Lutfi MF, Sharara GM, Saeed AM. "Role of N-Nitro-L-Arginine-Methylester as anti-oxidant in transient cerebral ischemia and reperfusion in rats." *Exp Transl Stroke Med*, 4, 5, 1, (2013):1-6.
12. Barrera G, "Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy." *SRN Oncol*, 10, 5402, (2012):1-21.
13. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU, "Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death." *Mol Aspects Med*, 29, 1-2, (2008):1-8.
14. Berkholz DS, Faber HR, Savvides SN, Karplus PA, "Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution." *J Mol Biol*, 3, 382, 2, (2008):371-84.
15. Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP, "Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes." *J Biol Chem*, 12, 282, 2, (2007):1183-92.
16. Board PG, Menon D, "Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology." *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5, (2013):3267-88.

17. Bompard GJ, Prévot DS, Bascands JL, "Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity." *Clin Biochem*, 23, 6, (1990):501-4.
18. Brigelius-Flohé R, Maiorino M, "Glutathione peroxidases." *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5, (2013):3289-303.
19. Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R, "Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta*, 1801, 8, (2010):924-9.
20. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S, "Experimental Models of Brain Ischemia: A Review of Techniques, Magnetic Resonance Imaging and Investigational Cell-Based Therapies." *Front Neurol*, 19, 5, 19, (2014):1-15.
21. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V, "Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models." *Food Chem Toxicol*, 60, (2013):38-44.
22. Chen PH1, Gao S, Wang YJ, Xu AD, Li YS, Wang D, "Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS." *CNS Neurosci Ther*, 18, 6, (2012):452-6.
23. Chen SH, Lin MT, Chang CP, "Ischemic and oxidative damage to the hypothalamus may be responsible for heat stroke." *Curr Neuropharmacol*, 11, 2, (2013):129-40.
24. Circu ML, Aw TY, "Glutathione and apoptosis." *Free Radic Res*, 42, 8, (2008):689-706.
25. Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC, Kola I, "Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury." *J Neurochem*, 78, 6, (2001):1389-99.
26. Cronk Jeff, "Glutathione," *Biochemistry dictionary of the Gonzaga University*, (2002); disponible en <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/G-index.cfm?definition=glutathione>
27. Deponte M, "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes." *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5, (2013):3217-66.
28. Doorn JA, Petersen DR, "Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal." *Chem Biol Interact*, 1, 143-144, (2003):93-100.
29. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP, "Mechanisms of ischemic brain damage." *Neuropharmacology*, 55, 3, (2008):310-8.
30. Dringen R, "Metabolism and functions of glutathione in brain." *Prog Neurobiol*, 62, 6, (2000): 649-71.
31. Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P, "The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator." *J Biol Chem*, 276, 5, (2001):3319-23.
32. Eto M, Kajihara N, Morita S, Tominaga R, "A novel electron paramagnetic resonance spin-probe technique demonstrates the relation between the production of hydroxyl radicals and ischemia-reperfusion injury." *Eur J Cardiothorac Surg*, 39, 4, (2011): 465-70.

33. Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S, "The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal." *Arch Biochem Biophys*, 477, 2, (2008):183-95.
34. Forman HJ, Maiorino M, Ursini F, "Signaling functions of reactive oxygen species." *Biochemistry*, 9, 49, 5, (2010):835-42.
35. Franco R, Cidowski JA, "Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant." *Cell Death Differ*, 16, 10, (2009):1303-14.
36. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA, "Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes", *J Biol Chem*, 8, 283, 32, (2008):21837-41.
37. Guzman-Lopez J, "Participacion de Glutati3n en el estr3s oxidativo durante un proceso isqu3mico cerebral en rata." Tesis de Licenciatura, 2011.
38. Halliwell B, Whiteman M, "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?." *Br J Pharmacol*, 142, 2, (2004):231-55.
39. Higgins LG, Hayes JD, "Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents", *Drug Metab Rev*, 43, 2, (2011):92-137.
40. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM, "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation." *Mol Aspects Med*, 32, 4-6. (2011):234-46.
41. INEGI. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/muertos1.pdf>. Fecha de consulta: Febrero 2014.
42. Jacob C, Knight I, Winyard PG, "Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways," *Biol Chem*, 387, 10-11, (2006):1385-97.
43. Johnson WM, Wilson-Delfosse AL, Mieyal JJ, "Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases," *Nutrients*, 4, 10, (2012):1399-440.
44. Kamel H, Ladecola C, "Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications." *Arch Neurol*, 69, 5, (2012):576-81.
45. Kristian T, Hu B, "Guidelines for using mouse global cerebral ischemia models." *Transl Stroke Res*, 4, 3, (2013):343-50.
46. Krueger M, H3rtig W, Reichenbach A, Bechmann I, Michalski D, "Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions." *PLoS One*, 8, 2, (2013):1-11.
47. Lash LH, "Renal membrane transport of glutathione in toxicology and disease." *Vet Pathol*, 48, 2, (2011):408-19.
48. Lipton P, "Ischemic cell death in brain neurons," *Physiol Rev*, 79, 4, (1999):1431-568.
49. Liu B, Liao M, Mielke JG, Ning K, Chen Y, Li L, El-Hayek YH, Gomez E, Zukin RS, Fehlings MG, Wan Q, "Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites." *J Neurosci*, 17, 26, 20, (2006):5309-19.
50. L3 JM, Lin PH, Yao Q, Chen C, "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems." *J Cell Mol Med*, 4, 4, (2010):840-60.

51. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE, "Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal*, 1,15, 7, (2011):1957-97.
52. Martínez-Sámano, Torres-Durán, Juárez-Oropeza, "El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral." *REB*, 30, 2, (2011):56-67.
53. Monnier GD, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J, "Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals, Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation." *Chem Res Toxicol*, 11, 10, (1998):1176-83.
54. Moreau R, Nguyen BT, Doneanu CE, Hagen TM, "Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycooxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats", *Biochem Pharmacol*, 1, 69, 1, (2005):29-40.
55. Morel F, Aninat C, "The glutathione transferase kappa family." *Drug Metab Rev*, 43, 2, (2011):281-91.
56. Morgenstern R, "Microsomal glutathione transferase 1." *Methods Enzymol*, 401, (2005):136-46.
57. NCBI: National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=36874>. Fecha de consulta: Enero 2014.
58. OMS. Global info base. Data for Saving Lives 2005. <https://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx?l=&Group1=RBTCntyByRg&DDLCntyByRg=ALL&DDLCntyName=999&DDLYear=2004&TextBoxImgName=go>. Fecha de consulta: Febrero 2014
59. OMS. Stroke, Cerebrovascular accident. http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/. Fecha de consulta: Febrero, 2014.
60. Ostrakhovitch EA, Semenikhin OA, "The role of redox environment in neurogenic development." *Arch Biochem Biophys*, 534,1-2, (2013):44-54.
61. Paulsen CE, Carroll KS, "Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches." *ACS Chem Biol*, 15, 5, 1, (2010):47-62.
62. Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G, "Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins", *Front Physiol*, 4, 4, 242, (2013):1-17.
63. Pulsinelli WA, Brierley JB, "A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat." *Stroke*, 10, 3, (1979):267-72.
64. Robinson TG, Reid A, Haunton VJ, Wilson A, Naylor AR, "The face arm speech test: does it encourage rapid recognition of important stroke warning symptoms?" *Emerg Med J*, 30, 6, (2013):467-71.
65. Smith SB, "The accumulation of glutamate in the diabetic retina may activate the NMDA receptor with subsequent deleterious consequences for cells, including the ganglion cells." *Drug News Perspect*, 15, 4, (2002):226-231.
66. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K, "A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of

- the glutathione peroxidase family and selenoprotein P." *J Biol Chem*, 25, 277, 43, (2002):41254-8.
67. Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M, "Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme." *Biochim Biophys Acta*, 1790, 11, (2009):1486-500.
68. Townsend DM, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ, Tew KD, "Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress." *J Biol Chem*, 2, 284, 1, (2009):436-45.
69. Vangilder RL, Davidov DM, Stinehart KR, Huber JD, Turner RC, Wilson KS, Haney E, Davis SM, Chantler PD, Theeke L, Rosen CL, Crocco TJ, Gutmann L, Barr TL, "C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis." *J Clin Neurosci*. S0967-5868, 13, (2013):00452-9.
70. Young O, Crotty T, O'Connell R, O'Sullivan J, Curran AJ, "Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia." *Head Neck*, 32, 6, (2010):750-6.

12. ANEXO A

Determinación de actividad de Glutación transferasa

Técnica

Homogenizar el tejido en PBS 50mM

Centrifugar a 10 000 por 10 minutos a 4 °C.

Pipetear 912.5µL Reactivo 1 + 50µL de reactivo 2 + 12.5µL del reactivo 3 + 25µL de muestra

Volumen final de reacción: 1mL

Medir ΔAbs a 405nm inicial y luego por 5 minutos a 37°C. La absorbancia se mide cada minuto y sacar el promedio de $\Delta Abs/min$. La reacción es decreciente por lo tanto la ΔAbs tiene que ir disminuyendo. Para estas mediciones ajustar a 0 el espectro con aire.

Correr un blanco de reactivo consistente en:

912.5µL del reactivo 1 + 50µL del reactivo 2 + 12.5µL del reactivo 3 + 25µL del reactivo 1.

Monitorear la $\Delta Abs/min$ del blanco exactamente de la misma forma que para la muestra.

Cálculos:

$$U/mg \text{ de proteína} = \frac{[(\Delta Abs \text{ muestra} - \Delta Abs \text{ blanco})4166.66]2}{mg \text{ de proteína total/mL}}$$

Donde:

4166.66 es un factor de la reacción

2 es la dilución inicial del homogenado (puede variar según se requiera dependiendo del tipo de tejido)

Preparación de los reactivos

Para calcular la masa que hay que pesar de cada reactivo cuando se especifique concentración molar se usa la fórmula de la molaridad de la cual se desprende que:

$$m = (M) (PM) (V)$$

Donde:

m = masa en gramos (g)

M = Molaridad

PM = Peso molecular

V = Volumen en litros.

Notas:

Recordar que:

1 mL = 1×10^{-3} litros por lo tanto si se quiere expresar 20 mL en la formula se puede usar la notación 20×10^{-3} litros

1 mM = 1×10^{-3} M ; y que $1\mu\text{M} = 1 \times 10^{-6}$ M

REACTIVO 1.- Buffer 0.1M de KH_2PO_4 pH 6.25. Se prepara en agua destilada, PM de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.09\text{g/mol}$

REACTIVO 2.- Es GSH (Glutación reducido) 30.7mg /mL en agua destilada

REACTIVO 3.- DNCB (1 cloro,2-4.dinitrobenceno) 76.8mg en 5mL de etanol al 95 o 70%

MUESTRA.- Se utiliza el sobrenadante que se obtuvo de homogenar en PBS 50mM (1X) en proporción de 2 partes de PBS por cada parte de tejido, por ejemplo 100 mg de tejido con 200 μL de PBS y centrifugado a 10 000 – 15 000rpm por 10 minutos a 4 °C.

Cálculos

El factor de 4166.66 viene de la Ley de Beer, utilizando 0.0096 μM que es el coeficiente de extinción o de absortividad molar del aducto que se forma, y de 40 que es el factor de dilución en el volumen de reacción.

Determinación de actividad de Glutación reductasa

Técnica

Homogenizar la muestra en PBS 50mM

Centrifugar a 10 000rpm por 10 minutos a 4 °C

Paso A: 440µL del reactivo principal + 60µL del buffer regulador + 40µL de muestra + 20µL de FAD 315µM

Leer la absorbancia inicial a 340nm y 37 °C y luego la Δ Abs/min durante 3min y sacar el promedio de Δ Abs/min **(A)**

Paso B: adicionar 20µL del buffer regulador + 60µL de GSSG

Leer la absorbancia inicial a 340nm y 37 °C y luego la Δ Abs/min durante 3min y sacar el promedio de Δ Abs/min **(B)**

Cálculos:

$[(B-A) \times 1608] \cdot 2 = \text{U/mL de Actividad de Glutación reductasa}$

$$\text{U/mg de proteína} = \frac{[(B - A) \times 1608] \cdot 2}{\text{mg de proteína/mL}}$$

1608 es un factor de la reacción

2 es el factor de dilución del homogenado suponiendo que se hayan preparado con 2 partes de PBS y una parte de tejido.

Importante pipetear en ese orden para favorecer la reacción, y poner las enzimas al final para que no transcurra demasiado tiempo hasta la lectura.

Preparación de los reactivos:

Muestra

La muestra se homogenea en buffer de fosfatos 50mM, se puede utilizar el homogenado o el sobrenadante, sin embargo se utiliza preferentemente el sobrenadante para que no haya variaciones en la lectura de la absorbancia por

sedimentación. La dilución del homogenado depende del tipo de tejido, en el cerebro una dilución 1:3 respecto de los mg de tejido dio buenas lecturas (2 partes de PBS y una parte de tejido).

BUFFER REGULADOR

Se compone de los siguientes reactivos:

KH_2PO_4 139mM y EDTA 0.76mM en agua destilada. Ajustar pH a 7.4 con NaOH diluido o HCl diluido según sea necesario.

PM del KH_2PO_4 = 136.09g/mol

PM del EDTA disodico = 372.24g/mol

Por muestra se requieren de buffer regulador:

Paso A: 440 μ L que van en el reactivo principal + 60 μ L del buffer regulador

Paso B: 20 μ L del buffer regulador

TOTAL = 520 μ L del buffer regulador de KH_2PO_4 139mM con EDTA 0.76mM
pH 7.4 por muestra

Importante aforar después de ajustar el pH para no perder la molaridad de la solución.

REACTIVO PRINCIPAL.

Se compone de: 18mL de buffer regulador y 2mL de NADPH 2.5mM, en total se obtienen 20mL.

Otra forma de expresar la concentración del reactivo principal es que lleva 0.25mM de NADPH en buffer regulador y en los cálculos es más rápido y da el mismo resultado.

FAD 315 μ M.

Se prepara en agua destilada. PM FAD = 829.51g/mol

GSSG 22mM

PM de GSSG = 612.6g/mol. Se prepara en buffer stock

Buffer stock (se prepara en agua destilada)

Lleva: Fosfato de sodio monobásico 12.5mM y EDTA disódico 6.3mM. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH diluido en agua destilada o HCl diluido en agua destilada según sea el caso, al prepararlo normalmente queda con un pH ácido por lo que hay que ajustar con NaOH diluido.

Determinación de actividad de Glutación peroxidasa

Técnica

Actividad de Glutación Peroxidasa

Homogenizar la muestra al 10% en frío en buffer de sucrosa

Centrifugar 10 – 15 minutos a 10 000rpm por 10 minutos a 4°C

100µL de muestra + 875µL de reactivo de acoplamiento

Incubar 3 minutos a 37°C

Adicionar 25µL de sustrato de hidroperóxido

Leer absorbancia inicial y luego cada minuto durante 2 minutos a 340nm y 37°C.

Calcular el promedio de Δ Abs/minuto

$$\text{Actividad de GPx (U/mL)} = \Delta\text{Abs/minuto} \times 161$$

$$\text{Actividad de GPx expresado como U/mg de proteína} = \frac{\Delta\text{Abs/minuto} \times 161}{\text{mg de proteína/mL}}$$

Importante pipetear en ese orden para favorecer la reacción, y poner las enzimas al final para que no transcurra demasiado tiempo hasta la lectura.

161 es un factor propio de la reacción calculado para las cantidades que se describen.

Cuando se requiera ajustar el pH del reactivo es mejor disolver los reactivos en agua destilada cercano al volumen final, ajustar el pH con NaOH o HCl diluidos en agua destilada y una vez ajustado ahora si aforar al volumen final esto es con el objeto de que no se pierda la concentración molar de la solución por que sufra alguna dilución al adicionarle lo necesario para el ajuste de pH

Buffer de sucrosa para homogenar

Para este análisis: Sucrosa funciona igual que sacarosa; PM sacarosa = 342g/mol

Se prepara buffer de fosfatos 50mM (PBS 1x), se le adiciona 1.15% de KCl, se ajusta el pH a 7.6 con NaOH o HCl (diluidos en agua destilada), este es el diluyente.

Luego se prepara con sucrosa 0.25M en ese diluyente.

También se puede expresar como: sucrosa 0.25M en buffer de fosfatos 50mM adicionado con 1.15 % de KCl a un pH de 7.6.

Reactivo de acoplamiento

Se prepara con: 33.6 mg de EDTA disódico (2mM) + 6.5mg de NaN₃ (azida de sodio 1mM) + 30 mg de GSH (glutación reducido 1mM) + 16.7mg de NADPH (0.2mM) + 100 Unidades de Glutation reductasa. Disolver en 100mL de buffer Tris – HCl 50mM pH 7.6

Buffer Tris=HCl 50mM .- Se prepara con 50mM de TRISMA BASE (PM 121.1 g/mol) en agua destilada y se ajusta el pH con HCl diluido hasta llegar a 7.6. Importante primero ajustar el pH y luego aforar para no perder la osmolaridad.

Sustrato de Hidroperóxido

Se prepara diluyendo 113.3µL de H₂O₂ 30% (1mM) en 1L de buffer Tris-HCl 50mM pH 7.6

Se recomienda preparar mínimamente 100 mL de este sustrato diluyendo 11.3µL de H₂O₂ 30% en 100mL de Tris-HCl 50mM pH 7.6 con el fin de minimizar los errores metodológicos.

Determinación de los productos de lipoperoxidación total y sus principales componentes

Técnica

Añadir en un tubo de cristal 650 μL de la solución I diluida, 200 μL de la muestra y agite en vibroagitador durante 3-4 sec.

Incluir un blanco que en lugar de muestra se adicionen 200 μL de agua destilada.

Esta técnica permite determinar el MDA solamente o el MDA + 4-HDA en dependencia de la marcha experimental.

Homogenizar la muestra en PBS 50mM

Centrifugar a 10 000rpm por 10 minutos a 4 °C

Añadir 650 μL de la Solución I diluida, 200 μL de muestra y 150 μL de ácido metanosulfónico al 99 % para analizar MDA+4-HDA o bien 150 μL de ácido clorhídrico al 35 % para analizar solo MDA.

Mezclar en vibroagitador 3-4 segundos , tapar los tubos, incubar a 45 °C por 40min para analizar MDA+4-HDA o bien 50 min para analizar solo MDA

Enfriar a temperatura ambiente

Centrifugar minutos a 3000rpm

Leer absorbancia a 586 nm contra blanco de reactivo

Realizar los cálculos por medio de la curva de calibración

Preparación de los reactivos:

I. Solución de N-metil-2-fenil-indol: Disolver 38 mg de N-metil-2-fenil-indol en 18 mL de acetonitrilo, lográndose una concentración de 10,3 mM. Antes de emplear la solución I debe diluirse adicionando aprox. 6 mL de metanol hasta alcanzar un volumen final de 24 mL (Solución I diluida).

II. Solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Patrón de MDA): Lograr una concentración de 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano. Adicionar 16,5 μL de este patrón de MDA (densidad 0.997 g/mL) en 10 mL de agua destilada o solución amortiguadora en que se encuentra diluida la muestra.

Preparación de la curva de calibración de MDA

Diluir la solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (patrón de MDA) en agua destilada o en la solución amortiguadora usada para diluir la muestra. Para ello tome 500 μL de la solución II y adiciónelos a un volumétrico de 50 mL y complete hasta 50 mL. Con este procedimiento se logra una concentración de 100 μM del patrón de MDA (Solución II diluida).

Solución II Conc. final (μM)	0	2,5	5	10	15	20
Solución I diluida (μL)	650	650	650	650	650	650
Solución II diluida (μL)	0	25	50	100	150	200
Agua destilada	200	175	150	100	50	0

Agite en vibroagitador, adicione 150 μL de ácido metanosulfónico o HCl 35%, agite en vibroagitador y cierre los tubos. Incube a 45°C durante 1 hora. Enfríe a temperatura ambiente y lea la absorbancia a 586 nm contra agua destilada.

Se debe lograr un coeficiente de correlación significativo ($> 0,90$) entre la absorbancia y la concentración en el intervalo de concentraciones de las muestras. La pendiente de esta recta corresponde al coeficiente de extinción molar aparente (ϵ). En las condiciones de trabajo del CIEB el valor de $\epsilon = 0,1141$ con un coeficiente de correlación de $r = 0,991$ y la ecuación de la recta $y = 0,1141 x + 0,1360$. Para el trabajo rutinario corra con las muestras el patrón de concentración 10 μM , extrapole el valor de D.O. en la curva, si el resultado no se desvía $\pm 5\%$ del valor esperado utilice $\epsilon = 0,1141$. Si la desviación es mayor de un 5% prepare una curva con todos los puntos.