



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION

**“Efecto del estrés oxidativo presente en la sangre de mujeres,
sobre la estructura química y función de la insulina”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA
PRESENTA:

MARÍA DE JESÚS RINCÓN VÍQUEZ

DIRECTORES DE TESIS

*DRA. IVONNE MARÍA OLIVARES CORICHI
DR. JOSÉ RUBÉN GARCÍA SÁNCHEZ*

DICIEMBRE 2009.

Esta tesis se realizó en:

1. Laboratorio de Bioquímica Inorgánica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.
2. Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

**Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACYT)**

- 1.- Beca Maestría: Expediente 215137, proyecto 20090030

ÍNDICE

	pág
Glosario	0
Relación de Figuras	
Relación de Tablas	
Resumen	
Abstract	
I. INTRODUCCIÓN	
1. ESTRÉS OXIDATIVO	
1.1. Concepto	
1.2. Especies Reactivas de Oxígeno	
1.2.1. Radicales libres	
1.2.1.a. Anión Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	
1.2.1.b. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	
1.2.1.c. Radical hidroxilo (HO^{\cdot})	
1.3. Especies Reactivas de Nitrógeno	
1.3.1. Oxido Nítrico (NO^{\cdot})	
1.3.2. Peroxinitrito	
1.4. Defensas Antioxidantes	
1.4.1. Antioxidantes enzimáticos	
1.4.2. Antioxidantes no enzimáticos	
1.5. Niveles de estrés oxidativo	
1.5.1. Adaptación	
1.5.2. Estrés oxidativo agudo	
1.5.3. Estrés oxidativo crónico	
1.6. Tipos de daño	
1.6.1. Daño no oxidante	
1.6.2. Daño oxidante	
1.6.2.1. Daño a lípidos	
1.6.2.2. Daño a proteínas	
1.6.2.3. Daño a carbohidratos	
1.6.2.4. Daño a ácidos nucleicos	
1.7. Estrés oxidativo y enfermedades asociadas	

2. OBESIDAD.
2.1. Concepto.
2.2. Clasificación.
2.3. Epidemiología.
2.3. Fisiopatología.
2.3.1. Factores genéticos.
2.3.2. Factores ambientales
2.3.3. Factores fisiológicos.
2.3.4. Factores biopsicosociales.
2.4. Consecuencias.
2.4.1. Inflamación.
2.4.2. Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.
2.5. Obesidad y estrés oxidativo.
3. INSULINA
3.1. Oxidación de la insulina <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
3.2. Proteínas oxidadas y su asociación con patologías.
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.
III. JUSTIFICACIÓN.
IV. HIPÓTESIS.
V. OBJETIVOS.
5.1. Objetivo General
5.2. Objetivo Específicos.
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.
6.1. Tamaño de la muestra.
6.2. Obtención de plasma e insulina recombinante humana (IRH) expuesta a sangre de pacientes obesas.
6.3. Cuantificación de proteínas
6.4. Marcadores de estrés oxidativo.
6.4.1. Determinación de Compuestos Reactivos al Ácido Tiobarbitúrico (MDA).
6.4.2. Determinación de Reducción de nitro-azul de tetrazolium (NBT).
6.4.3. Cuantificación de ditirosinas en plasma
6.4.4. Cuantificación de exposición de grupos carbonilo.
6.4.5. Determinación de grupos SH totales.
6.5. Electroforesis unidimensional en geles discontinuos de archilamida no desnaturalizantes

6.5.1. Tinción de geles (Tinción con azul de Coomassie)	
6.6. Purificación de proteínas.	
6.7. Evaluación de la actividad biológica de la insulina recombinante humana a través del efecto hipoglucemiante en ratón.	
VII. RESULTADOS.	
VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	
IX. CONCLUSIONES.	
X. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO.	
XI. BIBLIOGRAFÍA.	

Glosario

ERO	Especies reactivas de oxígeno
CuZnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre
GSH	Glutati3n reducido
O₂	Oxígeno molecular
NO₂	Dióxido de nitr3geno
O₂^{·-}	Ani3n superóxido
·OH	Radical hidroxilo
¹O₂	Singulete de oxígeno
HOCl	Ácido hipocloroso
HOBr	Ácido hipobromoso
O₃	Ozono
ONOO-	Peroxinitrito
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NO·	Óxido Nítrico
CAT	Catalasa
GSH-Px	Glutati3n peroxidasa
ADN	Ácido desoxirribonucleido
Met	Metionina
Lis	Lisina
MDA	Malondialdehído
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
Cis	Cisteína
Arg	Arginina
Pro	Prolina
Tre	Treonina
His	Histidina
Tir	Tirosina

Trp	Triptófano
Val	Valina
Leu	Leucina
LO[•]	Radical alcoxilo
LOO[•]	Radical peroxilo
AGESs	Productos avanzados de glicación
IMC	Índice de masa corporal
RE	Retículo endoplasmático
JNK	Cinasa Jun amino terminal
IKK	Cinasa IκB
NF-κB	Factor nuclear κB
PKC-θ	Proteína cinasa C isoforma θ
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
GPx	Glutación peroxidasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
GPx3	Glutación peroxidasa isoforma 3
IgG	Inmunoglobulina G
-SH	Grupo sulfihídrido
NBT	Nitroazul de tetrazolium
DT	Ditirosina
kDa	Kilodalton

Relación de figuras

Figura 1	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.
Figura 2	Sistemas antioxidantes enzimáticos.
Figura 3	Grupos carbonilo cuantificados en insulinas expuestas a sangre de mujeres con sobrepeso y obesidad 1.
Figura 4	Reducción de NBT cuantificado en insulinas expuestas a sangre de mujeres con sobrepeso y obesidad 1.
Figura 5	Patrón electroforético de insulinas oxidadas
Figura 6	Efecto hipoglicemiante de insulina nativa y expuesta a sangre de control, sobrepeso y obesidad 1.
Figura 7	Área bajo la curva del efecto hipoglicemiante de insulina expuesta a sangre de control, sobrepeso y obesidad 1.
Figura 8	Electroforesis proteínas purificadas
Figura 9	Efecto hipoglicemiante de insulinas purificadas
Figura 10	Área bajo la curva de insulinas purificadas

Relación de tablas

Tabla 1	Modificaciones oxidativas de proteínas
Tabla 2	Patologías asociadas con estrés oxidativo
Tabla 3	Clasificación de la obesidad considerando el IMC
Tabla 4	Evidencias de la asociación de EO y obesidad
Tabla 5	Proteínas modificadas oxidativamente
Tabla 6	Parámetros antropométricos y glicemias basales
Tabla 7	Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo
Tabla 8	Marcadores de daño a proteína (insulina)

“Efecto del estrés oxidativo presente en la sangre de mujeres, sobre la estructura química y función de la insulina”

Resumen

Recientemente se demostró, que la capacidad oxidante de la sangre de pacientes diabéticos induce modificaciones químicas y funcionales en la insulina y considerando que las enfermedades cronicodegerativas como la Diabetes Mellitus y la obesidad cursan con un estado metabólico denominado Estrés Oxidativo, nuestro objetivo fue determinar si la sangre de obesos, tiene capacidad oxidante suficiente para modificar la estructura y función de la hormona peptídica insulina (*recombinante*), para lo cual se obtuvieron muestras sanguíneas de pacientes con sobrepeso y obesidad 1 (n=16), con IMC de 25 a 34.9, entre 20-40 años de edad, utilizando sangre de personas sanas como controles. Se diseñó un sistema que consistió en colocar insulina dentro de una membrana de diálisis con un poro de 3,500 Da, la cual fue sumergida en la sangre recién obtenida de las pacientes y se incubó por 3 horas a 37 °C, después de este período se determinó daño oxidativo a la insulina, mediante la cuantificación de formazan por reducción de NBT y grupos carbonilo. Además se realizaron electroforesis no desnaturizantes y por último se evaluó el efecto hipoglucemiante de la insulina en ratón. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba pos hoc de Bonferroni, los resultados se muestran como promedios \pm DE y el valor de $p < 0.5$ se consideró estadísticamente significativo. Los resultados obtenidos fueron a) el incremento en las concentraciones de grupos carbonilo en ambos grupos estudiados sobrepeso (2.58 ± 0.4 nmol asazonas/mg proteína) y obesidad 1 (2.80 ± 0.44 nmol asazonas/mg proteína) en comparación con el grupo control (1.63 ± 0.34 nmol asazonas/mg proteína), b) el incremento de formazan en el grupo de obesidad 1 (83.5 ± 7.8 nmol formazan/mg de proteína) y d) disminución del efecto hipoglucemiante de la insulina oxidada por sangre de pacientes con obesidad 1 en un 18%, con lo pudimos concluir que la capacidad oxidante de la sangre de pacientes con obesidad 1 induce modificaciones químicas y estructurales en la insulina, modificando su función como hipoglucemiante en ratón.

Abstract.

Recently there was demonstrated, that the capacity oxidizer of the blood of diabetic patients induces chemical and functional modifications in the insulin and considering that the diseases cronicodegerativas as the Diabetes Mellitus and the obesity deal with a metabolic condition denominated Stress Oxidative, our aim was to determine if the blood of obese, capacity has sufficient oxidizer to modify the structure and function of the hormone peptídica insulin (recombinante), for which there obtained patients' blood samples with overweight and obesity 1 (n=16), with IMC from 25 to 34.9, between 20-40 years of age, using blood of healthy persons as controls. I design a system that consisted of placing insulin inside a membrane of dialysis with a pore of 3,500, it was immersed in the blood newly obtained of the patients and one incubated for 3 hours 37 °C, after this period decided damage oxidative to the insulin, by means of the quantification of formazan for NBT's reduction and groups carbonilo. In addition they were realized electroforesis not desnaturalizantes and finally the effect hipoglicemiante of the insulin in mouse was evaluated. The results were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) by a test *pos hoc* of Bonferroni, the results show themselves as averages \pm SD and the value of $p < 0.5$ was considered to be statistically significant. The obtained results were a) the increase in the concentrations of groups carbonilo in both studied groups overweight (2.58 ± 0.4 nmol asazonas/mg protein) and obesity 1 (2.80 ± 0.44 nmol asazonas/mg) in comparison with the group control (1.63 ± 0.34 nmol asazonas/mg protein), b) the increase of formazan in the group of obesity 1 (83.5 ± 7.8 nmol formazan/mg of protein) and d) decrease of the effect hipoglicemiante of the insulin oxidized by patients' blood with obesity 1 in 18 %, with we it could conclude that the capacity oxidizer of the patients' blood with obesity 1 induces chemical and structural modifications in the insulin, modifying his function as hipoglicemiante in mouse.

I INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. Concepto

El *estrés oxidativo* se presenta cuando el balance de formación de oxidantes excede la habilidad de los sistemas antioxidantes para remover especies reactivas de oxígeno (ERO).^{Etsuo N. and Yasukazu Y, 2005} Considerando lo anterior el estrés oxidativo puede presentarse; por una *disminución en los niveles antioxidantes* propiciado por: a) mutaciones que afectan la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) ó glutatión peroxidasa^{Emmanuelle y col. 2008,}; b) toxinas que depletan las defensas antioxidantes por ejemplo, dosis altas de xenobióticos que son metabolizados por conjugación con glutatión reducido (GSH) y que disminuyen las concentraciones de GSH, aún si el xenobiótico no es por sí mismo un generador de especies reactivas^{Yogesh y col. 1983} y c) deficiencia en la dieta de minerales que sirven como cofactores de las enzimas antioxidantes por ejemplo: Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se;^{Osaretin y col. 2008} o por un *incremento en la producción de especies reactivas* por: a) exposición de células u organismos a niveles altos de O_2 u otras toxinas que son por sí mismas especies reactivas (NO_2), o son metabolizadas para generar especies reactivas (paraquat)^{Masashi y col. 2007} y b) activación excesiva de sistemas naturales productores de especies reactivas (activación inapropiada de células fagocíticas en enfermedades inflamatorias crónicas).^{Santos-Silva y col. 2001}

Bajo circunstancias normales se presenta un balance entre la formación y neutralización de ERO que genera modificaciones mínimas en biomoléculas.

1.2. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

El oxígeno es vital en los procesos aerobios de los organismos vivos y cerca del 5% del oxígeno inhalado es convertido a *especies reactivas de oxígeno* (ERO). El concepto ERO incluye a los radicales libres de oxígeno ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, 1O_2) y a ciertos agentes oxidantes fácilmente convertibles en radicales por ejemplo: HOCl, HOBr, O_3 , $ONOO^-$, H_2O_2 . En otras palabras, todos los radicales libres de oxígeno son ERO, pero no todas las ERO son radicales libres de oxígeno, sin embargo todos se forman por la reducción incompleta del oxígeno molecular.

Se consideran ERO al oxígeno atómico (O); al ozono (O₃) que se genera con la unión del O al O₂, el oxígeno singulete (¹O₂) que se produce por la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂, el anión superóxido (O₂^{•-}) que se forma cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón, al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo ([•]OH) que es una especie parcialmente reducida (Fig. 2). Las especies reactivas como el anion superoxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son generados bajo numerosas condiciones in vivo. Estos se forman en el curso normal del metabolismo a través de la cadena mitocondrial de transporte de electrones y por la actividad de enzimas oxido reductasas como: NADPH oxidasa, mieloperoxidasa, xantina oxidasa, glucosa oxidasa, enzimas citocromo P450, y ciclooxygenasas.

1.2.1. Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado que las habilita como moléculas muy reactivas. Las fuentes generadoras de radicales libres incluyen en su mayoría reacciones bioquímicas de oxido-reducción presentes en el metabolismo normal en las que interviene el oxígeno por ejemplo: catabolismo del triptófano, formación del colágeno; reducción de los ribonucleótidos; la fagocitosis (como parte de una reacción inflamatoria controlada) y en respuesta a la exposición de radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo de cigarro, hiperoxia, ozono, ejercicio excesivo, dióxido de nitrógeno, metales pesados, hidrocarburos halogenados; entre otras. La producción controlada de radicales libres participa en varios procesos fisiológicos como: la fertilización del óvulo por el espermatozoide, la activación de genes, mecanismos de defensa del organismo durante una infección (lisis bacteriana), entre otros.

1.2.1.a. Anión superóxido (O₂^{•-})

El O₂^{•-} se produce principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial debido a que una parte de los electrones que pasan a través de esta son captados por el O₂. Esto ocurre principalmente a nivel de la ubiquinona (coenzima Q), la ubisemiquinona y el ubiquinol, que se originan al aceptar uno y dos electrones libres respectivamente y pueden ceder con facilidad un electrón al O₂. Otro sitio desde el cual los electrones

salen de la cadena respiratoria es el complejo I, NADH deshidrogenasa. Aproximadamente el 0.1% del O_2 que se consume en la respiración forma $O_2^{\bullet-}$. Otra fuente importante de $O_2^{\bullet-}$, es la activación de las células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) por agentes químicos y biológicos, llevando a cabo el llamado *estallido respiratorio*, a través del complejo enzimático NADPH oxidasa que tiene la función específica de sintetizar $O_2^{\bullet-}$.

1.2.1.b. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Estrictamente, el H_2O_2 no es un radical libre porque no posee electrones no apareados. Se forma por la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, en una reacción intracelular catalizada por la enzima superóxido dismutasa ó puede formarse en medio acuoso, donde el $O_2^{\bullet-}$ se dismuta de manera espontánea generando H_2O_2 y oxígeno (Bannister y Rotilio, 1987). Su vida media depende de la presencia o ausencia de enzimas encargadas de removerlo del medio como la catalasa o la glutatión peroxidasa.

1.2.1.c. Radical hidroxilo ($\bullet OH$)

Se genera por la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 . Tiene una vida media de 1×10^{-9} s y su radio promedio de acción es de 30 Å. También puede formarse, al estar presente el radical $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en un medio biológico que contiene hierro o cobre. El $\bullet OH$ puede interactuar a una velocidad muy alta con las moléculas biológicas: carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos, formando radicales libres de aquellas moléculas con las que reaccionó (Janssen, 1993).

Este radical también se produce por radiaciones electromagnéticas naturales (radiaciones cósmicas o del gas radón), o generadas por el hombre (radiaciones X, γ , etc); que pueden romper el agua y generar radicales $\bullet OH$.

Por otra parte, el $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico (NO^{\bullet}), generando peroxinitrito ($ONOO^-$) el cual, al hidrolizarse se escinde en una molécula de radical hidroxilo ($\bullet OH$) y una de bióxido de nitrógeno (NO_2).

1.3. ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO

También el oxígeno forma compuestos con el nitrógeno y éstos pueden ser más reactivos que el O_2 en su estado basal de energía. Estas especies son el óxido

nítrico (NO^\bullet), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y el peroxinitrito (ONOO^-) los cuales se conocen como especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Fig. 2).

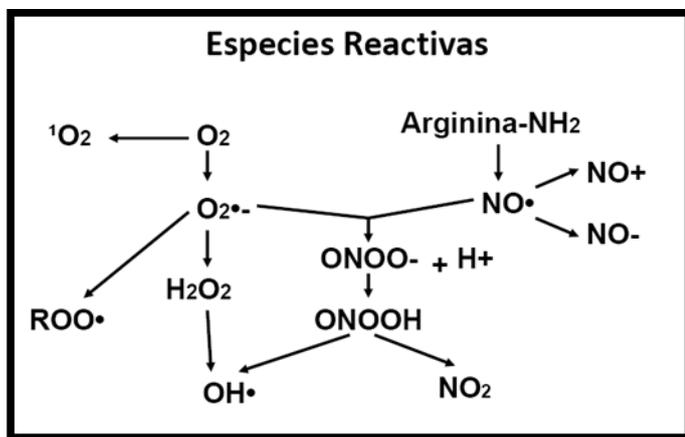
1.3.1. Oxido nítrico (NO^\bullet)

El oxido nítrico puede existir en tres formas, dependiendo el estado de óxido-reducción del nitrógeno: el catión nitrosonio (NO^+), el anión nitroxilo (NO^-) y el oxido nítrico (NO^\bullet). Su biosíntesis esta catalizada por una familia de enzimas llamadas óxido nítrico sintasas que catalizan la oxidación del aminoácido L-arginina dando como producto el oxido nítrico y la L-citrulina, con la formación del intermediario N-hidroxil-L-arginina.

1.3.2. Peroxinitrito

El peroxinitrito no es un radical, pero si es un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo. ^{Janssen y col. 1993} El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles, de nitrar residuos de tirosina ^{Golstein y col. 2000}, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar ADN: los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el NO^\bullet para formar 3-nitrotirosina. ^{Beckman y col. 1996}

Fig. 1 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno



1.4. Defensas antioxidantes

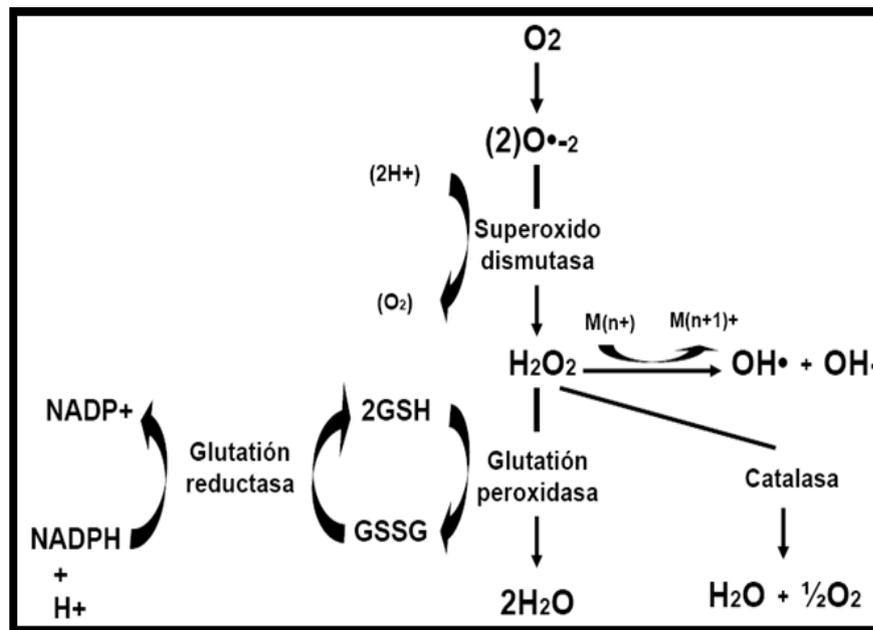
Las células y tejidos tienen sistemas antioxidantes que neutralizan el potencial oxidante de las ERO. Estos antioxidantes incluyen enzimas como catalasa, superóxido dismutasa, peroxirredoxinas y glutatión peroxidasa, así como compuestos de bajo peso molecular como vitamina C, E y glutatión reducido (GSH) entre otros.

Ahora bien los antioxidantes se han clasificado de diferentes maneras, pero la más utilizada es la que establece las diferencias según su estructura química y función biológica, dividiéndolos en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

1.4.1. Antioxidantes enzimáticos

Este grupo está conformado por defensas antioxidantes que tienen como función evitar la reducción univalente del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar esa reacción. Uno de ellos es el sistema sistema citocromo-oxidasa, el cual reduce más del 90% del oxígeno en el organismo humano. En segundo lugar están algunas enzimas especializadas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) entre otras (Fig.).

Fig. 2 Sistemas antioxidantes enzimáticos.



1.4.2. Antioxidantes no enzimáticos

Además de las enzimas mencionadas, hay un gran número de compuestos que poseen propiedades antioxidantes. Dependiendo de su origen podemos clasificarlos en *endógenos*: a) glutatión reducido (GSH), b) proteínas (bilirrubina, albúmina), c) ácido urico, entre otros y *exógenos* a) vitaminas como: riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y α -tocoferol (vitamina E) b) carotenoides y c) flavonoides. Algunos minerales como selenio, zinc y cobre actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes. Siendo esenciales para la defensa contra el daño oxidativo debido a que actúan como atrapadores de radicales libres endógenos ^(Krinsky, 1992).

1.5. Niveles de estrés oxidativo

Dependiendo de la intensidad con la que se presente el estrés oxidativo en un organismo vivo puede presentarse un proceso adaptativo, estrés oxidativo agudo o estrés oxidativo agudo. ^{MacCord J.M. 2000}

1.5.1. Adaptación

La *adaptación* es la respuesta de la célula u organismo tendiente a equilibrar por medio de sobreexpresión genética y activación enzimática la sobreproducción de ERO. El resultado final es una protección parcial o total contra el daño, que puede crear una condición de resistencia a niveles intensos y constantes de estrés. En contraste, cuando no es posible lograr esta adaptación o se agota la capacidad antioxidante, se presenta un daño que puede ser de intensidad y duración muy variable (estrés oxidativo agudo o crónico). ^{Crawford y col. 1994}

1.5.2. Estrés oxidativo agudo

El *estrés oxidativo agudo* genera cambios estructurales y funcionales que suelen ser más sutiles que en el proceso crónico y generalmente es mediado por las ERO menos reactivas como son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suele acompañar también a procesos crónicos.

1.5.3. Estrés oxidativo crónico

El *estrés oxidativo crónico* es mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación que amplifican y propagan el daño celular y tisular.

1.6. Tipos de daño

El estrés agudo y crónico, generan dos tipos de daño, el oxidante y el no oxidante, sin embargo en el estrés agudo la eliminación del reto oxidante permite una recuperación celular y del organismo; en contraste al crónico donde el daño es frecuentemente irreversible.

1.6.1. Daño no oxidante

En el estrés oxidativo no todo el daño es causado por oxidaciones, pues se ha demostrado que en la célula hay alteraciones no oxidantes, caracterizadas por un desequilibrio en los procesos homeostáticos de regulación celular, como son alteraciones en la concentración, compartimentalización y distribución del calcio intracelular. ^{Gunter 2000}

Una consecuencia de la elevación de calcio citoplasmático se refleja en el impedimento de la adecuada función mitocondrial ^{Jornot y col. 1999}. La exposición prolongada a concentraciones altas de calcio citoplasmático provoca una alteraciones del citoesqueleto, pérdida de la integridad membranal y la estimulación de diversos mecanismos catabólicos, como proteólisis, degradación membranal (fosfolípidos) y fragmentación de la cromatina, lo que conduce a la muerte celular.

Sin embargo en las células fagocíticas este incremento de calcio intracelular, que es pasajero y regulado, se traduce en la producción de anión superóxido durante el estallido respiratorio, con el fin de funcionar como bactericida.

1.6.2. Daño oxidante

Bajo estas condiciones las biomoléculas sujetas al ataque directo de ERO, potencian un daño fisiológico y molecular. Las consecuencias generadas por este tipo de daño se observan en biomoléculas por ejemplo: oxidación de proteínas, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (lipoperoxidación), oxidación de ácidos nucleicos y en menor grado oxidación de carbohidratos. ^{Barry H. y Matthew W. 2004}

Estas reacciones pueden alterar: a) las propiedades intrínsecas de la membrana (permeabilidad y transporte iónico), b) disminuir la actividad enzimática, c) inhibir la síntesis de proteína y d) dañar el ADN (escisión de la hebra de ADN y modificación de las bases de ácidos nucleicos); propiciando muerte celular.

El daño oxidativo es común en enfermedades crónico-degenerativas contribuyendo al inicio de la enfermedad o como consecuencia de la misma. ^{Jakus V. 2000}

1.6.2.1. Daño a lípidos

La presencia de un doble enlace adyacente a un grupo metileno debilita las uniones C-H de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo tanto los hidrogenos se vuelven más propensos al ataque por radicales libres. La lipoperoxidación se inicia por radical hidroxilo, radical alcoxilo y radical peroxilo. Los radicales peroxilo pueden reaccionar con otros lípidos, proteínas y ácidos nucleicos propagando este proceso mediante la transferencia de electrones atrayéndolos cerca del sustrato susceptible a oxidación. La membrana celular que estructuralmente esta compuesta por una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, son altamente susceptibles al ataque oxidativo y por consecuencia se generan cambios en la permeabilidad, transporte iónico y función metabólica celular.

1.6.2.2. Daño a proteínas

La oxidación de proteínas esta definida como una modificación covalente de una proteína inducida directamente por ERO o indirectamente por una reacción secundaria con productos de estrés oxidativo. ^{Shacter y col. 2000}

Las cadenas laterales de los aminoácidos son susceptibles al estrés oxidante, generando modificaciones en su estructura por diversos mecanismos, que se enlistan en la tabla 1.

En consecuencia la exposición de proteínas [receptores, proteínas de transporte (albúmina), enzimas (deshidrogenasa de glutamato dependiente del NADPH), hormonas (gonadotropina equina e insulina humana recombinante)] a sistemas generadores de radicales libres conduce a la modificación de su estructura y por consecuencia a: a) disminución o pérdida de la actividad enzimática, b) disminución de la función de la proteína, c) disminución de la actividad inhibitoria de proteasa, d) agregación proteica, e) disminución de la susceptibilidad a proteólisis, f) respuesta celular anormal, g) modificación de genes de transcripción, h) incremento de la inmunogenicidad, entre otras.

Actualmente solo se ha identificado un mecanismo de reparación enzimático para restaurar Met de sulfoxido de Met y para restaurar sulfidrilos de Cis sulfidos. La formación es catalizada por Met sulfoxido reductasa, que se acompaña por reducción equivalente de GSH. Por otro lado las proteínas oxidadas pueden ser removidas de los tejidos y células por proteólisis. La eliminación específica de proteínas oxidadas se lleva a cabo por una proteasa multicatalítica (proteasoma), la cual distingue entre las formas de proteína oxidada y no oxidada. Los defectos en la actividad del proteasoma puede deberse a la acumulación de proteínas dañadas en alguna condición de enfermedad o en el envejecimiento

Tabla. 1 Modificaciones oxidativas de proteínas

Tipo	a.a. involucrado	Fuente de oxidación
Disulfidos, glutatiolacion	Cis	Todos, ONOO ⁻
Sulfoxido de metionina	Met	Todos, ONOO ⁻
Carbonilos (aldehídos y cetonas)	Todos (Lis, Arg, Pro, Tre)	Todos
Oxo-histidina	His	Rayos γ, OCM, ¹ O ₂
Ditirosina	Tir	Rayos γ, OCM, ¹ O ₂
Clorotirosina	Tir	HOCl
Nitrotirosina	Tir	ONOO ⁻
Modificaciones triptofanil	Trp	Rayos γ
Derivados hidroxy	Val, Leu, Tir, Trp	Rayos γ
Cloraminas y diaminación	Lis	HOCl
Aductos de lipoperoxidación (MDA, HNE y acroleína)	Lis, Cis, His	Rayos γ, OCM (no HOCl)
Aductos con a.a. oxidados	Lis, Cis, His	HOCl
Aductos por glicoxidación	Lis	Glucosa
Entrecruzamineto, agregados y fragmentación	Varios	Todos

OCM= oxidación catalizada por metales; Todos= rayos γ, OCM, HOCl, ozono, ¹O₂.

1.6.2.2.a. Oxidación catalizada por metales.

La oxidación de proteínas catalizada por metales de transición es una reacción que ha sido extensamente estudiada. Se presenta por ataque oxidativo directo sobre los residuos de aminoácidos (Lis, Arg, Pro, Tre) de una proteína reacciona con un metal de transición (Fe^{2+} ó Cu^{2+}) reduce al H_2O_2 formando un intermediario reactivo ($\bullet\text{OH}$, radical ferril, etc.), en la proximidad de la cadena lateral del aminoácido y pueden transformar los grupos amino de las cadenas laterales de varios aminoácidos en carbonilos.^{Stadtman 1990.}

1.6.2.2.b. Formación de carbonilos

La exposición de grupos carbonilo surge por: a) la oxidación de algunos residuos de aminoácidos por ataque directo de radicales libres como: lisina, arginina, prolina e histidina (lisina, arginina y prolina).^{Uchida y col. 1990}, b) por el rompimiento de enlaces peptídicos de la estructura primaria de la proteína, c) por el rompimiento de puentes de hidrógeno de la estructura secundaria^{Garrison, 1987}, d) por reacciones con carbohidratos reductores (glicación)^{Miyata, 2002}, y e) por reacciones secundarias de cadenas laterales de los aminoácidos (lisina) con productos de lipoperoxidación como el 4-hidroxi-2-nonenal y MDA

1.6.2.2.c. Formación de aductos

Las modificaciones oxidativas indirectas de las cadenas laterales de los aminoácidos en las proteínas ocurren a través de la formación de aductos con productos de lípidos, proteínas, carbohidratos y glutatión modificados oxidativamente. Por ejemplo, la lipoperoxidación genera productos como hidroxinonenal (HNE), Malondialdehído (MDA) y acroleína que se unen covalentemente a residuos de Lis, His y Cis, generando la adición de aldehídos a la proteína.

Las proteínas también son sensibles al ataque por intermediarios producidos durante la lipoperoxidación, como el alcoxilo LO^\bullet y el peroxilo LOO^\bullet , siendo los aminoácidos histidina y prolina los más susceptibles.

Además productos de oxidación de aminoácidos libres pueden formar enlaces covalentes con las proteínas. La glutatiónilación de residuos de Cis también puede ocurrir bajo condiciones de estrés oxidativo.

1.6.2.2.d Oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos.

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen las proteínas son susceptibles al ataque por radicales libres aunque algunos son más susceptibles como: metionina, triptófano, fenilalanina, tirosina, cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina e histidina. La modificación de las cadenas laterales conduce a la alteración directa de la estructura y la función de la proteína, fragmentación, polimerización o incremento de la susceptibilidad a proteólisis. ^{Silvester y col. 1998} La lisina, prolina y arginina, son aminoácidos que al oxidarse de forma directa por radicales $\cdot\text{OH}$ genera carbonilos.

1.6.2.3. Daño a carbohidratos

La oxidación de carbohidratos (llamada también auto-oxidación de las hexonas) induce la formación de enediones, que en presencia de metales de transición generan especies reactivas, como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. ^{Hicks, 2002} Este proceso se observa en la Diabetes Mellitus, donde la hiperglucemia sostenida conduce a la formación de productos de glicación avanzada (AGESs), entre el grupo aldehído de la glucosa y el grupo amino libre de una proteína modificando la estructura de esta última. ^{Miyata, 2002} La carboximetilisina representa una forma de modificación proteica generada por productos de oxidación de carbohidratos cita.

1.6.2.4. Daño a ácidos nucleicos

En células eucariontes las moléculas que con menor frecuencia se alteran, son los ácidos nucleicos, debido a su localización celular y su empaquetamiento (cromosomas). Las ERO pueden causar daño oxidativo al ADN nuclear y mitocondrial. El daño incluye la modificación de bases, la oxidación de deoxiribosa, el entrecruzamiento y la escisión de las cadenas de ADN. El ataque por radical hidroxilo de las bases que conforman el ADN genera productos que incluyen a) 8-oxo-7,8 dihidro-2-de deoxiguanosina; b) 2,6-diamino-4-hidrosi-5-formaminodipiridina, c) 8-OH-adenina, d) 2-OH-adenina, e) glicoltimina, f) glicolcistina, etc. El daño al ADN inducido por ERO incluye varias alteraciones por ejemplo: a) mutaciones que

surgen por modificaciones selectivas en sitios G:C que indican ataque selectivo por ERO, b) la acción de 8-oxo-deoxi-guanosina como un promutagen altera la unión de la enzima metilasa al oligomero inhibiendo la metilación de citocinas (mecanismo que ha sido reportado en casos de desarrollo de cáncer). Se ha demostrado que las ERO generan mutaciones del protooncogen humano C-Ha-ras-1 y del gen supresor de tumor p53. Las ERO pueden interferir con la señalización celular normal, alterando la expresión de genes contribuyendo con el desarrollo de cáncer por regulación redox de activación de factores transcripcionales y/o por modulación oxidativa de la cascada de proteínas cinasas. Las ERO también inducen genes de respuesta temprana al estrés como *c-fox*, *c-jun*, *jun-B*, *jun-D*, *c-myc*, *erg-1* y *hemo-oxigenasa 1*. La activación de protooncogenes de respuesta temprana juega un papel vital en la transducción, conduciendo a proliferación y transformación celular. El daño oxidativo al ADN mitocondrial también involucra modificación de bases y escisión de la cadena de ADN, que altera el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial; resultando un incremento en la generación de ERO por escape de electrones y por lo tanto daño celular adicional. El daño oxidativo al ADN mitocondrial puede promover cáncer y envejecimiento eventualmente.

1.7. Estrés oxidativo y enfermedades asociadas

El daño oxidativo observado a nivel de biomoléculas ha sido ampliamente estudiado en múltiples patologías que se han asociado con estrés oxidativo de los cuales solo se enlistan algunas de ellas.

Tabla. 2 Patologías asociadas con estrés oxidativo

Patología	Efectos de ERO en la patología	Referencias
Edema pulmonar agudo, síndrome de distrés respiratorio agudo, inflamación e hiperoxemia.	Inflamación mediada por ERO y disfunción endotelial.	William 2001.
Degeneración macular asociada con la edad.	Reacción fotoquímica en el ambiente rico en oxígeno de la retina que conduce a liberación de ERO.	Hubschman y col. 2009.
Envejecimiento.	Daño celular y alteraciones metabólicas	
Enfermedad de Alzheimer.	Péptido amiloide y productos finales de glicación avanzada: neurotoxicidad mediada por ERO a células de hipocampo y membranas sinápticas.	Van Gool. Y col 2003.
Aterosclerosis.	Disfunción endotelial mediada por	Singh y col. 2006

	superóxido por activación de macrófagos.	
Enfermedades autoinmunes.	Inflamación mediada por ERO y destrucción celular.	Kumagai y col 2003
Cáncer.	Mutación de genes mediada por ERO (modificación de bases puricas y pirimidicas), modificaciones postraduccionales y disrupción de procesos celulares.	Sun y col. 2005
Diabetes.	Formación acelerada de ERO por productos finales de glicación avanzada.	Kawahito y col 2009.
Hipertensión.	Proliferación de células de músculo liso mediada por ERO, producción de oxidantes vía NADH/NADPH oxidasa y disfunción endotelial.	Ehud 2008
Enfermedad de Huntington.	Desregulación transcripcional mediada por ERO y daño mitocondrial.	Dalrymple 2007
Patología renal.	Inflamación mediada por ERO y disfunción endotelial.	Ramos y col.2008
Patología hepática.	Daño al DNA mediado por ERO con evolución a cáncer: Inflamación mediada por ERO y destrucción tisular.	Hagymási y col. 2001
Infarto al miocardio.	Daño isquemia-reperfusión conducido por ERO, necrosis de miocito y/o apoptosis.	Park y col. 2009
Pancreatitis.	Inflamación mediada por ERO y destrucción tisular.	Gómez 2002.
Enfermedad de Parkinson.	Disfunción mitocondrial mediada por ERO.	Ferger y col 2004.
Preclamsia.	Disfunción endotelial mediada por ERO.	Maarten y col 2004.
Obesidad	Inflamación mediada por ERO	Furukawa y col 2004

2. OBESIDAD

2.1. Concepto de obesidad

La obesidad se define como un trastorno metabólico caracterizado por una ganancia calórica neta almacenada en forma de tejido adiposo, resultado de la ingesta excesiva de nutrientes y de un gasto energético mínimo.

2.2. Clasificación de obesidad

La obesidad se clasifica de acuerdo a su etiología, distribución topográfica de la grasa o considerando únicamente el Índice de Masa Corporal (IMC). Si consideramos su etiología destacan la obesidad de origen endocrino, hipotalámico, genético y la ocasionada por medicamentos. De acuerdo a la disposición topográfica de la grasa se puede tener un predominio superior (obesidad central o androide) ó inferior (obesidad periférica o ginecoide). En la primera, más propia de los varones, la grasa se acumula en la cara, región cervical, tronco, región supraumbilical y grasa abdominal profunda (obesidad visceral). Este tipo de acumulación grasa está ligada

a complicaciones metabólicas como son las cardiovasculares y resistencia a la insulina que dan lugar al síndrome prurimetabólico. Por otra parte, en la obesidad periférica o ginecoide, propia de las mujeres, la grasa se acumula en la parte inferior del cuerpo, región infraumbilical del abdomen, caderas, región glútea y muslos.

Si consideramos únicamente el IMC de acuerdo a la Food and Agricultural Organization (FAO) de la Organización Mundial de la Salud ^(WHO 2000).

$$IMC = \frac{\text{peso}(kg)}{\text{estatura}^2(m^2)}$$

La obesidad se clasifica como se muestra en la tabla.

Tabla. 3 Clasificación obesidad considerando el IMC

Tipo	Grado	IMC
Bajo peso		< 18.5
Normal		18.5-24.9
Sobrepeso		25.0-29.9
Obesidad	I	30.0-34.9
	II	35.0-39.9
Obesidad mórbida	III	≥ 40

2.3. Epidemiología de la obesidad

La obesidad actualmente, se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud. Su prevalencia aumenta progresivamente y afecta a todos los países, incluso a aquellos en desarrollo en los que hasta hace poco la mala nutrición era un problema endémico.

La obesidad representa una pandemia que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo y la tendencia va en constante aumento. Los cambios en el estilo de vida (poca actividad física y aumento en la ingesta) son, en gran parte, responsables del incremento en la incidencia de sobrepeso y obesidad aún en edades tempranas de la vida.

En el ámbito nacional la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006 (ENSANUT 2006), mostró que la prevalencia de sobrepeso fue más alta en hombres

(42.5%) que en mujeres (37.4%); en cambio, la prevalencia de obesidad fue mayor en mujeres (34.5%) en relación con los hombres (24.2%).

Los datos que arrojó esta encuesta mostraron un aumento en la prevalencia de obesidad en los últimos siete años, algo verdaderamente alarmante, debido a que se observa en todos los grupos de edades.

2.4. Fisiopatología de la obesidad

La contribución genética y ambiental en la etiología de la obesidad ha sido evaluada en múltiples estudios, los cuales reportan que un 30 a un 40% de la variación en el índice de masa corporal se atribuye al factor genético y un 60 a un 70% al factor ambiental. La interacción entre factores genéticos y ambientales es importante dado que la población presenta predisposición genética para desarrollar obesidad, pero el genotipo puede ser expresado solamente bajo ciertas condiciones ambientales adversas como la dieta alta en grasa y el estilo de vida sedentario.^{Stunkard.1988.}

2.4.1. Factores genéticos

El papel del factor genético ha sido bien identificado. Un estudio realizado en gemelos jóvenes alimentados con 1,000 kcal por día, por un periodo de 100 días, presentaron una ganancia de peso de 4.3 a 13.3 kg, siendo la ganancia significativamente más baja entre las parejas de gemelos que entre los gemelos. La ganancia de peso fue similar entre los pares de gemelos evidenciado en el peso corporal, porcentaje de grasa, masa grasa y grasa subcutánea. En otras palabras algunas parejas de gemelos ganaron mucho más peso que otras. La concordancia en respuesta entre gemelos idénticos demostró el impacto de la genética sobre la ganancia de peso.^{Bouchart y col.1990.}

Otro estudio que apoya la contribución del factor genético en la obesidad es el realizado en adultos, que de niños fueron adoptados; los cuales fueron clasificados como delgados, normales, sobrepeso u obesos. Notablemente la clasificación de su peso estuvo fuertemente relacionada con el IMC de sus padres biológicos, pero no con el IMC de sus padres adoptivos, en contraste el peso de los infantes en sus primeros dos años no estuvo relacionado con el IMC tanto materno como paterno.^{Stunkard y col.1999.}

2.4.2. Factores ambientales

El aumento exagerado en la prevalencia de la obesidad en los últimos 20 años se ha propiciado también por cambios en el ambiente que condicionan el aumento del aporte energético y la disminución de la actividad física, inclusive en sujetos sin predisposición genética

El impacto de los factores ambientales se ilustra en un estudio realizado en Indios Pima, ^{Ravussin.1994} residentes de Arizona que presentan un alta prevalencia de obesidad, a pesar de que la predisposición genética es similar a la de los Indios Pima del Norte de México, estos últimos presentaron IMC más bajos debido a que los estilos de vida entre ambos grupos difieren. Estos grupos fueron separados hace aproximadamente 700 a 1000 años y ahora difieren en el tipo de dieta y en el gasto energético. Los Indios Pima que viven en México tienen una dieta baja en calorías y en grasa animal y presentan un mayor gasto energético por su actividad física.

El estilo de vida sedentario es cada vez más frecuente y es un factor condicionante de obesidad, algunos estudios sugieren que la disminución del gasto calórico tiene mayor impacto que el aumento en el aporte calórico. ^{Prentice y col 1995.} Por otro lado se ha observado que la reducción en el número de horas de ver televisión redujo la aparición de obesidad. ^{Robinson 1999.} Por otro lado se ha observado una mayor prevalencia de obesidad en adultos con incapacidades físicas, sensoriales o con enfermedades mentales. ^{Levine y col. 2000.}

2.4.3. Factores fisiológicos

La notoria relación del ambiente con factores fisiológicos tiene representación en la epidemia de obesidad en países industrializados donde ha surgido una abundante disponibilidad de comida, ingesta de alimentos al final del día y reducción de la actividad física. Esta llamada “mutación ambiental”, ocasiona que el sistema nervioso central pierda la capacidad para detectar ritmos internos y externos ya que el sistema nervioso central emplea al sistema nervioso autónomo para restaurar el ritmo interno, ya que se ha propuesto que el desequilibrio y pérdida de este ritmo sean parte de los mecanismos que originan el síndrome metabólico. ^{Kreier 2003.}

2.4.4. Factores psicosociales

Actualmente algunos trastornos psiquiátricos se han relacionado con la obesidad. Uno de ellos es el síndrome del “comer nocturno” que se define como el consumo de al menos el 25% de la energía total entre la cena y el desayuno del siguiente día. Este trastorno se acompaña de alteraciones en el sueño y se considera un componente de la apnea del sueño y ocurre en el 10 al 64% de los sujetos obesos. Otro trastorno alimentario relacionado es el denominado por atracón caracterizado por el consumo de grandes cantidades de comida en un periodo relativamente corto, con la sensación subjetiva de pérdida de control y sin una conducta compensatoria, su prevalencia es el 7.6 a 30% en distintos grupos de obesos. ^{Stuncard y col. 1966.}

La obesidad hiperfágica progresiva se inicia desde la infancia y los sujetos afectados generalmente tienen un peso mayor a 140 kg a los 30 años. ^{Bray1976.}

Otros determinantes sociales que contribuyen al aumento de la prevalencia de obesidad son los fenómenos migratorios, la transculturización, el aumento de las porciones de alimentos, las condiciones de urbanización no aptas para caminar, la falta de cultura nutricional, las ofertas sin fin de soluciones fantásticas para la obesidad y las condiciones económicas que favorecen todo lo anterior haciendo de la obesidad una consecuencia inevitable.

2.5. Consecuencias

La obesidad frecuentemente se asocia con resistencia a la insulina, alteración que es consecuencia de un estado de inflamación sistémica de bajo grado y la clave está en la función del tejido adiposo que se encuentra aumentado.

2.5.1. Inflamación

El tejido adiposo es un órgano secretor que produce moléculas llamadas adipocitocinas entre las cuales se encuentran la leptina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuinas (IL-6, IL-8, IL-1), adiponectina, leptina, resistina, entre otras. ^{Rosen y col. 2006}

Hace poco más de una década, la primera molécula vinculada con inflamación y obesidad fue el TNF- α que fue descubierto e identificado como una citosina inflamatoria sobreexpresada en el tejido adiposo en un modelo de obesidad en

roedores^{Sethi y col. 1999}. La administración de TNF- α recombinante en cultivo celular y animal integro modificó la acción de la insulina y en ratones obesos con función anormal del TNF- α o de su receptor mejoró la sensibilidad a la insulina.^{Uysal y col. 1997.} Particularmente en modelos experimentales esta claro que la sobreproducción de TNF- α en tejido adiposo es característico en obesidad y contribuye significativamente en la resistencia a la insulina. Rápidamente se ha establecido que la obesidad se caracteriza por una respuesta inflamatoria temprana y que muchos mediadores inflamatorios modifican sus patrones de expresión y/o impactan en la acción de la insulina de manera similar al TNF- α en modelos animales que van de ratones hasta gatos, hasta seres humanos.^{Weisberg y col. 2003}.

La obesidad promueve un estado de inflamación crónica de bajo grado y resistencia a la insulina, sin embargo, en ausencia de obesidad, la infusión de animales con citosinas inflamatorias puede causar resistencia a la insulina.^{Yu y col. 2002}. Adicionalmente, humanos con alguna otra condición inflamatoria crónica presentan incremento en el riesgo de padecer diabetes, por ejemplo cerca de una tercera parte de pacientes con hepatitis crónica C, desarrolla diabetes tipo 2 y elevación de niveles de TNF- α .^{Knobler y col. 2003}.

Los mecanismos por los cuales la obesidad genera un estado de inflamación crónica son: a) La activación de vías inflamatorias por estrés de retículo endoplásmico (RE). Este es particularmente el caso del tejido adiposo; el cual es sometido a cambios severos en la arquitectura del tejido, incremento en la síntesis de lípidos y proteínas y disturbios en el flujo de nutrientes intracelulares y energía. En cultivos celulares y animales integros, el estrés RE condujo a activación de JNK y esto contribuyó a la resistencia a la insulina^{Ozcan y col. 2004}. Interesantemente el RE también activa IKK y puede activar mecanismos en común de estas dos importantes vías de señalización.^{Hung y col. 2004}. b) Otro mecanismo importante que genera inflamación en la obesidad, es el estrés oxidativo, debido al incremento en el aporte de glucosa al tejido adiposo. Las células endoteliales en la almoadilla grasa incrementa la entrada de glucosa a través de sus transportadores constitutivos de glucosa. El incremento en la entrada de glucosa por las células endoteliales en condiciones de hiperglicemia causa un exceso en la producción de ERO en mitocondria, lo cual genera daño oxidativo y activación de las cascadas de señalización inflamatorias en el interior de la célula

endotelial. ^{Brownlee. 2001.} El daño endotelial en el tejido adiposo puede atraer células inflamatorias como macrófagos y exacerbar la inflamación local. La hiperglucemia también estimula la producción de ERO en adipocito, lo cual conduce al incremento en la producción de citosinas inflamatorias. ^{Lin y col. 2005.}

2.5.2. Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia

La resistencia a la insulina se presenta fisiológicamente durante el período de adolescencia, existiendo una fuerte interrelación con el índice de masa corporal (IMC) en prepúberes y púberes, correspondiendo al período de rápido crecimiento y desarrollo, evento que se resuelve al final de la pubertad. En el embarazo se ha observado un fenómeno similar que permite la vida del binomio. (Jensen M.D 2000)

El concepto de resistencia a la insulina fue descrito por Himsworth y se ha observado en diversas enfermedades metabólicas. La resistencia a la insulina condiciona a hiperinsulinemia e hiperglucemia, que se asocia con un incremento significativo de la morbimortalidad cardiovascular relacionada con diabetes mellitus 2, hipertensión arterial y obesidad. La baja sensibilidad a la insulina por tejidos insulino dependientes, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que presentan síndrome metabólico con obesidad central o abdominal pone de manifiesto la importancia del tejido adiposo como factor etiológico clave.

Actualmente varios estudios han demostrado que la inflamación crónica y el estrés presente en el tejido adiposo pueden influir en la vía de señalización de la insulina. (Urakawa y col. 2003)

La insulina activa su vía de señalización a través de la unión a su receptor. La interacción insulina-receptor genera una cascada de señalización ^(Saltiel y col. 2002). La inhibición de la vía de señalización por moléculas inflamatorias es uno de los mecanismos propuestos en el desarrollo de resistencia a la insulina. De hecho la exposición de células a niveles elevados de TNF- α o concentraciones elevadas de ácidos grasos libres estimula la fosforilación inhibitoria de residuos de serina del sustrato de receptor de insulina 1 (IRS-1) ^(Aguirre y col. 2000). La disminución en la fosforilación del IRS-1 y su menor capacidad de asociarse con el receptor de la insulina, es otro mecanismo de inhibición de la acción de la insulina ^(Aguirre 2002).

Varias serina/treonina cinasas activadas por estímulos inflamatorios en la obesidad pueden inhibir la vía de señalización de la insulina, entre las cuales tenemos a la cinasa JNK, cinasa inhibidora de NF-κB (IKK) y PKC-θ (Zick, 2003).

La asociación de obesidad con diabetes tipo 2 ha sido reconocida por décadas, las principales bases de este vínculo es la capacidad de la obesidad para generar resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es un aspecto fundamental en la etiología de diabetes tipo 2 y es también un vínculo para otras secuelas fisiopatológicas incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, aterosclerosis y enfermedad de ovario poliquístico. Reav. 1995. La insulina es un regulador crítico de casi todos los aspectos de la biología del adipocito y el adipocito es uno de los tipos celulares que mejor responden a la insulina. La insulina promueve el almacenamiento de triglicéridos en el adipocito promoviendo la diferenciación de preadipocito a adipocito y su maduración; estimula el transporte de glucosa y la síntesis de triglicéridos e inhibe la lipólisis. La insulina también incrementa la entrada de ácidos grasos provenientes de lipoproteínas por estimulación de la enzima lipoproteinlipasa en el tejido adiposo. Los efectos metabólicos de la insulina son mediados por acciones tejido específicas que involucran cambios rápidos en la fosforilación y función de proteínas, cambiando la expresión de genes.

El término “resistencia a la insulina” usualmente denota resistencia a los efectos de la insulina sobre la entrada de glucosa, metabolismo o almacenamiento. La resistencia a la insulina en obesidad se manifiesta por decremento en el transporte y metabolito de glucosa estimulado por insulina a nivel de músculo esquelético y adipocito y por dificultad en la supresión de producción de glucosa hepática. Reave. 1995.

2.6. Obesidad y estrés oxidativo

Existen evidencias que muestran la asociación de obesidad con marcadores de daño oxidativo (Keaney J y col., 2003). Los mecanismos mediante los cuales la obesidad desencadena estrés oxidativo son: a) el tejido adiposo que se encuentra en exceso, es fuente importante de citocinas inflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (FNT-α), Higdon J. and Frei B. 2003 las cuales son un potente estímulo para la producción de ERO en macrófagos y

monocitos, además el FNT- α inhibe la cadena respiratoria mitocondrial, incrementando la interacción de los electrones con O₂ generando O₂•⁻. Fenster C. y col.

2002 b) Otro mecanismo involucra un efecto de los triglicéridos elevados sobre el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y se ha propuesto que el incremento de los triglicéridos intracelulares, inhiben el translocador de adenin nucleotidos fomentando la generación de O₂•⁻. Fenster C. y col. 2002.

Multiples estudios han asociado al estrés oxidativo con obesidad como se muestra en la tabla 4.

Tabla. 4 Evidencias de la asociación de EO y obesidad

ERO	SA	Referencias
↑MDA	↓Cuzn-SOD, ↓GPX y CAT	Farshad y col 2007
↑8-epi-PGF _{2α}		Bin W.U. y col. 2009
↑TBARS y ↑8-epi-PGF _{2α}	↓Cuzn-SOD, ↓GPX y ↓CAT	Shigetada y col. 2004
↑TBARS	↓SOD (eritrocito), ↓capacidad atioxidante	Wysocka y col. 2008
↑Peroxidación de membranas	↓GSH/GSSG	Cazzola y col. 2004
↑8-epi-PGF _{2α}		Keaney y col. 2003
↑TBARS	↓Cuzn-SOD, ↓GPX y ↓capacidad atioxidante	Tinahones y col. 2008
↑F ₂ -isoprostanos	↓Tioles proteicos	Ramos y col. 2008
↑Carbonilos y GPx	↓catalasa, ↓GSH	
↑8-epi-PGF _{2α}		Uracahua 2003
↑TBARS, ↑hidroperoxidos	↓capacidad antioxidante	

Los lípidos participan en la regulación de la inflamación y el metabolismo. Niveles plasmáticos elevados de lípidos son característicos en la obesidad, infección y otros estados inflamatorios. La hiperlipidemia en obesidad es responsable en parte de inducir en tejidos periféricos resistencia a la insulina y dislipidemia que contribuyen al desarrollo de aterosclerosis. Es interesante hacer notar que los cambios metabolicos característicos de la respuesta de fase aguda son también proaterogenicos; alterando el metabolismo de lípidos que es benefico a corto plazo en la lucha contra infecciones, siendo dañino si se mantiene crónicamente. La importancia de lípidos biactivos es también evidente en la regulación de vías de señalización producidas por lípidos a través de proteínas unidas a acidos grasos o receptores nucleares. El rol de lípidos en enfermedades metabolicas, es compleja. La hiperlipidemia conduce a un incremento en la entrada de acidos grasos en células musculares y la producción de metabolitos de acidos grasos que estimulan cascadas inflamatorias e inhiben la señalización de la insulina^{Yu y col. 2002.} La obesidad incrementa la mecánica y la carga metabolica del miocardio, auamentando

el consumo de oxígeno en éste. Una consecuencia negativa del consumo elevado de oxígeno a nivel de miocardio es la producción de ERO como el anión superóxido, radical hidróxido y peróxido de hidrógeno por incremento en la respiración mitocondrial, ^{Turrens. 1997} generando el escape de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que promueve la reducción de un electrón del oxígeno molecular resultando en la formación de radicales superóxido. ^{Kukraja y col. 1992.}

El daño celular progresivo y acumulativo resultado del aumento de masa corporal en la obesidad puede causar incremento de la lipoperoxidación debido a que el daño celular causa producción de citosinas, especialmente TNF- α el cual genera ERO en los tejidos que conducen a lipoperoxidación. ^{Lachieitner.2000.} Otro posible mecanismo que genera lipoperoxidación está dado por la dieta. Debido al predominio de la obesidad nutricional donde las dietas hiperlipídicas contribuyen con la génesis de esta patología y el exceso en el consumo de lípidos involucra al metabolismo de oxígeno contribuyendo en la génesis de ERO.

En la obesidad una consecuencia del proceso oxidativo es la lipoperoxidación que conlleva a la formación de varios metabolitos, como el MDA que es capaz de modificar oxidativamente proteínas ricas en aminoácidos Lis, Cis y His. ^{Dalle-Donner y col 1993.} Es importante mencionar que las proteínas oxidadas adquieren la reactividad suficiente para oxidar a otras biomoléculas, estableciendo una reacción en cadena.

Las células contienen ambos tipos de defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas), que trabajan colectivamente removiendo ERO y otros oxidantes. ^{Decsi 1997}

En fases tempranas del desarrollo de obesidad la actividad de enzimas antioxidantes es estimulada, sin embargo, cuando persiste la obesidad por largo tiempo, como en los humanos la fuente de enzimas antioxidantes comienza a depletarse, conduciendo a un nivel bajo de actividad. La consecuencia de una baja actividad de las enzimas citoprotectoras en la obesidad humana produce daño tisular progresivo, el cual puede generar aterosclerosis, cáncer y otras enfermedades. ^{Amirkhizi y col.2007} Las condiciones prooxidantes como hipoxia e inflamación reduce la expresión de GPx₃ en tejido adiposo contribuyendo al decremento en la actividad plasmática de GPx que es la principal enzima antioxidante en la circulación y se ha demostrado su asociación con estrés oxidativo.

^{Kenet y col. 1999.} Es bien sabido que la reducción en las concentraciones de vitamina E

contenidas en la membrana celular, compromete la habilidad de la célula para defenderse contra radicales hidroxilo.^{Yu 1994}

3. INSULINA

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans; esta constituida por una cadena α de 21 aminoácidos y una β de 30 aminoácidos, unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios y una mas intercatenario. Posee un peso molecular de 6,500 daltones, con un punto isoelectrico a pH 5.4,^{Farias, 1999} su vida media plasmática es de aproximadamente 6 minutos y desaparece de la circulación en 10 a 15 minutos.

Sus efectos se observan en diversos tejidos que son sensibles a la hormona como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, en los cuales promueve la síntesis de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos.

Los efectos de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos incluyen: estimulación del transporte de glucosa a través de las membranas de los adipocitos y de las células musculares; reulación de la síntesis de glucógeno hepático, e inhibición de la formación de glucosa a partir de glucógeno (glucogenólisis) y de los aminoácidos precursores (gluconeogénesis). El resultado final de todas estas acciones es una reducción de la glicemia. Con relación al metabolismo de las proteínas, la insulina promueve la transferencia de aminoácidos a través de las membranas plasmáticas, estimula la síntesis proteica e inhibe la proteólisis. La incorporación de ácidos grasos a partir de triacilgliceroles circulantes en triacilgliceroles del tejido adiposo y síntesis de lípidos son estimuladas por la insulina, la lipólisis e inhibida. La insulina contribuye a la síntesis de ácidos nucleicos mediante estimulación de la síntesis de ATP, ADN y ARN.

3.1. Oxidación de insulina *in vitro* e *in vivo*.

La insulina es una hormona peptídica, constituida por una cadena alfa de 21 aminoácidos y una beta con 30 aminoácidos, unidas por dos enlaces disulfuro y de acuerdo a literatura 28 de los 51 aminoácidos que la componen, son susceptibles a daño por especies reactivas.

Estudios previos *in vitro*^{Corichi y col. 2005.} demostraron que al exponer insulina recombinante humana a radicales HO[•] mediante la reacción de Fenton, genero cambios químicos incluyendo hidroxilación e incremento de lo grupos carbonilo libres, afectando la conformación de los residuos de aminoácidos y consecuentemente la estructura primaria de la insulina, incluyendo cambios en los epitopos antigénicos de la hormona y estos cambios generaron pérdida de su función biológica. Evidencia reciente en un modelo *in vivo* mostró que la incubación de insulina en sangre de pacientes diabéticos descontrolados indujo modificaciones químicas en la hormona y decremento de su actividad, sugiriendo la participación de ERO en este proceso.^{Corichi y col 2009.}

3.2. Proteínas oxidadas y su asociación con patologías

La siguiente tabla contiene una lista parcial de algunas proteínas oxidadas que han sido identificadas *in vivo* en diversas patologías.

Tabla. 5 Proteínas modificadas oxidativamente

Modificación	Patología
Carbonilos	
Glutamina sintetasa	Envejecimiento, Alzheimer, isquemia/reperfusión
IgG	Artritis reumatoide
Proteínas renales	Exposición crónica a estrógenos
Proteínas pulmonares	Hiperoxia
Proteínas cerebrales	Isquemia/reperfusión
Proteínas del cristalino	Cataratas
Proteínas musculares	Distrofia muscular (pollo)
Proteínas no identificadas	Envejecimiento
Proteínas no identificadas	Parkinson
Proteínas no identificadas	Edema pulmonar neonatal
Sulfoxido de metionina	
Inhibidor de proteasa α-1	Fumadores, bronquitis, sinovitis
Lipoperoxidación	
LDL	Ateroesclerosis
Glutatiolación (oxidación SH)	
Anhidrasa carbonica III	Envejecimiento
Proteínas musculares	Distrofia muscular (pollo)
Proteínas no identificadas	Activación de monocitos
3-clorotirosina, ditirosina	
LDL	Ateroesclerosis
Hidroperoxileucina	
Proteínas no identificadas	Cataratas
Nitrotirosina	
Proteínas no identificadas	Inflación aguda pulmonar, ateroesclerosis, artritis reumatoide
Agregados	
IgG	Artritis reumatoide

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que el estrés oxidativo se presenta por desbalance entre la producción de ERO y su neutralización por sistemas antioxidantes, siendo una de sus consecuencias daño oxidativo a biomoléculas, que ha permitido asociarlo con múltiples patologías, siendo una de ellas la obesidad; enfermedad asociada con proceso inflamatorio crónico de bajo grado, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, aunado a que se ha demostrado *in vitro* que la insulina puede ser modificada por ERO, es posible plantear que el estrés oxidativo presente en la sangre de mujeres obesas pueda modificar la insulina recombinante humana. Lo anterior permitiría plantear un nuevo mecanismo de inactivación de la insulina que estaría relacionado con la resistencia a la insulina observada en pacientes obesos.

III. HIPÓTESIS

Las especies reactivas de oxígeno generadas por estrés oxidativo presente en sangre de mujeres obesas, modifican la estructura y función de la insulina recombinante humana.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las modificaciones químicas y funcionales de la insulina recombinante humana, inducidas por estrés oxidativo presente en sangre de mujeres obesas.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que las mujeres obesas se encuentran en estado de estrés oxidativo
2. Detectar modificaciones químicas en la insulina recombinante humana producidas por su exposición a sangre de mujeres obesas.
3. Determinar que la insulina recombinante humana modificada por estrés, presenta alteraciones en su función.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, que incluyó mujeres de 20 a 40 años de edad, con un Índice de Masa Corporal (IMC) de 25-34.9, quienes previamente firmaron un consentimiento informado. Se excluyeron mujeres que presentarán infección activa (VIH, hepatitis); patología asociada con estrés oxidativo (diabetes mellitus 1 o 2, cáncer, hipertensión arterial, hipotiroidismo, etc.); que estuvieran con algún tratamiento para obesidad seis meses previos a su ingreso al estudio o estuvieran tomando algún suplemento alimenticio que contuviera antioxidantes. El grupo control consistió de mujeres de 20 a 40 años de edad con IMC de 18.5 a 24.9 sanas.

6.1. Tamaño de muestra

El tamaño de la de la muestra se estimó por grupo con la fórmula para un estudio comparativo de dos promedios ^(Leon 2003).

Se consideró el Índice de Masa Corporal (IMC), para clasificar a las pacientes de acuerdo a la Food and Agricultural Organization (FAO) de la Organización Mundial de la Salud ^(WHO 2000).

6.2. Obtención de plasma e insulina recombinante humana expuesta a sangre de pacientes obesas.

Se obtuvieron 10 mL de sangre venosa periférica de la arteria braquial media utilizando tubos con heparina sódica (86 unidades USP). Se midió la glicemia basal con una tira reactiva convencional, empleando un glucómetro digital (Ascensia contour Bayer). Seis mililitros de sangre se incubaron tres horas a 37°C, en un tubo de polipropileno; previamente se colocó en su interior una bolsa de diálisis de cinco centímetros de longitud por un centímetro de diámetro, con un poro de 3,500Da, conteniendo 1.5mg (300µL) de insulina humana recombinante. Al término de la incubación se retiró la bolsa y se recuperó la insulina. Los cuatro mililitros de sangre restantes fueron centrifugados a 3,500 rpm durante 15 min para obtener el plasma. La insulina y plasma fueron almacenados a -4°C hasta su procesamiento.

6.3. Marcadores de estrés oxidativo

6.3.1. Determinación de productos de lipoperoxidación.

Uno de los biomarcadores más frecuentemente usados como indicador de niveles de lipoperoxidación en plasma son las concentraciones de MDA, uno de los productos finales de lipoperoxidación.^{Chursh 1985.}

La cuantificación de MDA plasmático por la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA) se basa en la formación de un aducto entre el MDA y dos moléculas de TBA (MDA-TBA₂).^{Sinnhuber 1958.} La formación del aducto es iniciada por un ataque nucleofílico involucrando al C-5 del TBA con C-1 del MDA seguido por deshidratación y la reacción del intermediario MDA-TBA con una segunda molécula de TBA.^{Nair 1984.} El anticoagulante usado durante la toma de muestra, el tipo y concentración del ácido usado en el procesamiento de la muestra y el tiempo de duración del calentamiento de la muestra afecta la cantidad de aducto formado. Estos factores combinados con la diferencia en la sensibilidad de los numerosos métodos analíticos empleados, dificultan la interpretación de resultados, sin embargo, la técnica de TBA es un indicador del estado actual de formación y degradación de ácidos grasos peroxidados y sigue siendo un parámetro comúnmente usado.

100µL de plasma fueron mezclados con 400µL de amortiguador Tris-base 7.2 mM, pH 8 y 1mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375%. Se incubó a 90°C durante 15 minutos, se dejó preenfriar la reacción (3-5 min) y se agregó 500µL de HCl 0.2N. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 529nm.^(Yagi 1998)

6.3.2. Determinación de proteínas oxidadas por reducción de nitro-azul de tetrazolio (NBT) a formazán.

Los residuos de fenilalanina presentes en las proteínas son susceptibles al ataque por radicales hidroxilo (HO·), dando lugar a la formación de tirosinas que al continuar expuestas a radicales HO· se hidroxilan nuevamente formando derivados reducidos como es el caso del catecol 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) que unida a una proteína y en presencia de metales de transición (como lo es el cobre que hay en la reacción de Fenton) forma ortoquinonas,^(Giese 1993) las cuales son reductoras del compuesto nitroazul de tetrazolio (NBT) generando formazán que es cuantificado espectrofotométricamente a 530nm.

Se tomaron 20 μ L de plasma y se mezclaron con 1mL NBT 0.28 mM (preparado al momento de usarse en glicina 2M, pH 10). Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz y se realizaron lecturas de absorbancia a 530nm. (Gieseg y col. 1993)

La determinación de reducción de NBT en insulina recombinante humana oxidada se realizó empleando 50 μ L de insulina desarrollando el mismo procedimiento.

6.3.3. Cuantificación de ditirosinas.

El daño oxidativo, particularmente a proteínas, ha sido extensamente estudiado como un factor causal de disminución de capacidad funcional durante el envejecimiento y en enfermedades, por lo tanto los productos de oxidación de tirosinas pueden ser usados como marcadores de estrés oxidativo *in vivo*. La formación de ditirosinas es una forma indirecta de medir el ataque de los radicales hidroxilo a las tirosinas de una proteína. El HO \cdot hidroxila residuos de fenilalanina, generando tirosinas, siendo estas nuevas tirosinas y las presentes en la proteína susceptibles nuevamente al ataque por HO \cdot , extrayendo un electrón generando radicales tirosilo y H₂O, buscando estabilizarse estos radicales tirosilo formando enlaces covalentes con un radical tirosilo adyacente dando lugar a la formación de ditirosinas, compuestos que presentan propiedades fluorescentes.

Se tomaron 100 μ L de plasma y se mezclan con 1.9mL de urea 6M (preparada en NaHCO₃ 0.1M, pH 9.8), se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose las unidades relativas de fluorescencia (URF) a 320 nm de excitación y 405 nm de emisión. (Manlencik 1996)

6.3.4. Determinación de carbonilos.

Entre las varias modificaciones oxidativas de aminoácidos en proteínas, la formación de carbonilos es un marcador temprano de oxidación de proteínas y es el biomarcador más utilizado para cuantificar daño a proteína. El método espectrofotométrico más utilizado se basa en hacer reaccionar los grupos carbonilo presentes en la proteína con el compuesto DNPH, generando dinitrofenilhidrazonas que son un producto estable, detectable a 370nm de longitud de onda, con un coeficiente de extinción de 22,000.

Se tomaron 50 μL de plasma y se mezclaron con 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), 10mM preparada con HCl 2.5M, teniendo cada problema su respectivo blanco consistiendo de 50 μL de plasma y 500 μL de HCl 2.5M; se incubaron 1h a temperatura ambiente, protegidos de la luz y agitándose gentilmente cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado. La pastilla obtenida se disolvió en 1mL de TCA al 2.5% y se centrifugó a 3000rpm por 10 minutos, decantando el sobrenadante. La pastilla se disolvió en 2mL de etanol/acetato de etilo 1:1, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado y se dejó secar la pastilla 5 minutos. El precipitado final fue disuelto en 1mL de guanidina 6M, pH 2.3 e incubado 10 minutos a 37°C, las lecturas de absorbancias fueron determinadas a una longitud de onda de 370nm. (Dalle-Donne 2003)

La determinación de grupos carbonilo en insulina recombinante humana oxidada se realizó utilizando 50 μL de esta insulina y desarrollando el protocolo anteriormente mencionado.

6.3.5. Determinación de grupos sulfhidrilos totales.

El reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) o DTNB es usado para cuantificar grupos tiol. Los grupos tiol reaccionan con este componente, rompiendo la unión disulfido generando 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^-), el cual se ioniza en agua a pH alcalino o neutro generando el dianión TNB^{2-} . Este TNB^{2-} es de color amarillo. La reacción es rápida y estequiométrica, la adición de un mol de tiol produce un mol de TNB^{2-} . El TNB^{2-} es cuantificado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia en luz visible a 412nm, usando como coeficiente de extinción $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esta técnica puede ser usada para medir grupos tiol en moléculas de bajo peso molecular como glutatión, en soluciones puras y muestras biológicas como sangre y también mide la cantidad de grupos tiol en proteínas.

Se tomaron 50 μL de plasma y se mezclaron con 450 μL de Tris-base (0.2M, pH 8.2), 50 μL de 5,5 ditiobis-2-nitro-ácido benzoico (DNBT 1.5mM) y 450 μL de metanol absoluto, teniendo cada problema su respectivo blanco consistiendo de 50 μL de plasma, 500 μL de Tris-base (0.2M, pH8.2) y 450 μL de metanol absoluto. Los tubos

fueron incubados a temperatura ambiente durante 30min y protegidos de la luz. Una vez transcurrido el período de incubación se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se realizaron las lecturas de absorbancias a una longitud de onda de 412nm. (Ellman GL. 1959)

6.4. Electroforesis unidimensional en geles discontinuos de acrilamida no desnaturalizantes.

Se empleo la técnica de electroforesis unidimensional reportada por Hames and Rickwood, 1981. Los geles resolutivos se realizaron usando el sistema de BIORAD al 15% y se prepararon mezclando en un matraz Erlenmeyer las siguientes soluciones: 1.69mL de solución acrilamida/bis acrilamida (44%/1.2% respectivamente); 1.25mL de Tris-base 1.5M, pH 8.8; 1.98mL de agua destilada, 25 µL de persulfato de amonio al 10% y 2.5 µL de TEMED. La mezcla se deposito entre la superficie de dos placas de vidrio y se aplano colocando isopropanol sobre la superficie. Polimerizado el gel se preparó un gel concentrador, mezclando las siguientes soluciones: 250 µL de solución acrilamida/bis acrilamida (44% /1.2% respectivamente); 1.59mL de Tris base 0.5M, pH 6.8; 625 µL de agua destilada; 12.5 µL de persulfato de amonio al 10% y 1.25 µL de TEMED.

La mezcla se depositó sobre el gel resolutivo. Se introdujo el peine y se dejo polimerizar a temperatura ambiente. Se disolvieron las muestras de proteínas en buffer de muestra 5x (Tris HCl 1M, pH 8.3; glicerol, azul de bromofenol, agua destilada) empleando un quinto del volumen de la muestra y se colocaron dentro de los pozos del gel.

Polimerizado el gel, se colocó en la cámara de electroforesis, se retiro el peine y se lleno la cámara con buffer de corrida (Tris base 0.02M y glicina 0.2M, pH 8.3). Se colocaron las muestras y se desarrollo la electroforesis a 100 volts.

6.4.1. Tinción de geles (Tinción con azul de coomassie)

Después de la electroforesis el gel de poli(acrilamida) se colocó en un contenedor y se cubrió con solución fijadora (Metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua 40 %) e incubando por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se colocó la solución de tinte por 10 minutos (Metanol 50% (v/v), azul de Coomassie brillante R-25, 0.05%

(v/v), ácido acético 10% (v/v) y agua 40%. Posteriormente el gel fue lavado 2 veces con suficiente agua para eliminar el exceso de solución de tinte. Se agregó solución de destinte (ácido acético 7%, metanol al 5% y agua 88%) se mantuvo en agitación por 30 minutos, se realizaron varios lavados hasta la aparición de bandas azules y un fondo claro.

6.5. Purificación de insulina modificada.

Las proteínas fueron purificadas empleando el método de elución de proteínas descrita por (Hunkapiller y Lujan, 1986). La insulina fue sometida a un gel de poliacrilamida, un carril del gel fue cortado y tinto con azul Comassie como previamente se describió. Este carril sirvió como guía para identificar el lugar de corrimiento electroforético de las proteínas de interés. Identificado el sitio de corrimiento se cortó el gel y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Se agregó 1 ml del buffer de elución (Tris HCl 50mM, NaCl 150mM y EDTA 0.1mM) y se incubó a 37°C toda la noche. Transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante, se cuantificó la cantidad de proteína presente y se corroboró su integridad por medio de electroforesis empleando el método ya descrito.

6.6. Evaluación de la actividad biológica de la insulina recombinante humana a través del efecto hipoglucemiante en ratón.

Se formaron cuatro grupos de 24 ratones cada uno, hembras, cepa BALB-c, con un peso de 20 ± 2 g, de 2-4 semanas de edad, con ciclo vigilia sueño invertido de 12 por 12, con alimento y agua a libre demanda. Previa anestesia con pentobarbital a una dosis de 50mg/Kg de peso, se midió la glicemia basal utilizando una tira reactiva convencional y un glucometro digital (Ascensia contour Bayer), obteniendo la muestra por medio de una incisión en el vértice de la cola y posteriormente se administró vía intraperitoneal cualquiera de los siguientes tratamientos 100µl de solución salina 0.9%, 1.6µg de IRH nativa, 1.6µg de IRH oxidada por sangre de voluntarios sanos ó 1.6µg de IRH oxidada por sangre de mujeres obesas; realizando mediciones de glicemia a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

VII. RESULTADOS

El trabajo se inicio formando tres grupos de estudio (control, sobrepeso y obesidad 1), respetando los criterios de inclusión y exclusión (ver material y métodos). Los parámetros antropométricos y glicemias basales de los grupos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros antropométricos y glicemias basales

Parámetro	control (n=16)	sobrepeso (n=16)	obesidad 1 (n=16)
Peso (Kg)	54.7 ± 1.7	70.5 ± 1.6*	82.1 ± 2.8**
Edad (a)	25.6 ± 1.4	25.2 ± 1.1	28.5 ± 1.5
IMC (Kg/m²)	21.4 ± 0.4	27.3 ± 0.4*	31.6 ± 0.4**
Glicemia (mg/dL)	82.5 ± 1.8	88.1 ± 2.1***	89.1 ± 2.0***

*p<0.0001 & CT y O1, **p<0.0001 & CT y SP, *** p<0.0001 & CT. Análisis de varianza (ANOVA) con una prueba pos hoc de Bonferroni. Los valores representan promedios ± DE.

Como se puede observar en la tabla 6, el grupo de sobrepeso y obesidad presentaron un mayor peso en comparación al grupo control, diferencia que fue estadísticamente significativa, que se reflejó en el Índice de Masa Corporal (IMC). Es importante mencionar que la clasificación de los participantes en estos grupos se realizó tomando en consideración el IMC de acuerdo a lo establecido por la OMS (tabla 3).

Por otro lado, se pudo observar que los valores de glicemia basal en el grupo de sobrepeso y obesidad 1 fueron mayores en comparación al grupo control (diferencia estadísticamente significativa). Si bien, los valores de glicemia basal en estos grupos se encontraron dentro de los límites normales para glicemia basal (70-110 mg/dL) (NOM-015-SSA2-1994) los valores de glicemia en el grupo de sobrepeso y obesidad 1 presentaron una tendencia al valor límite superior.

7.1. Determinación del estado de estrés oxidativo en los grupos estudiados.

Para poner de manifiesto que el grupo de sobrepeso y obesidad 1 se encontraban en un estado de estrés oxidativo se cuantificaron los siguientes marcadores plasmáticos de daño a biomoléculas; Malondialdehído (MDA) que es un producto final de lipoperoxidación; como marcadores de daño a proteína se determinó grupos carbonilo libres, reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT) y formación de dímeros de tirosinas (ditirosinas). La determinación de grupos sulfidrilos (-SH) totales se evaluó como indicador de defensa antioxidante.

La tabla 7, muestra los valores obtenidos de cada uno de los marcadores analizados. Como se puede observar los grupos de sobrepeso y obesidad 1 presentaron un aumento en las concentraciones de MDA en comparación con el grupo control, diferencia que fue estadísticamente significativa. Además se observó una disminución de los grupos SH totales en el grupo de sobrepeso y obesidad 1 en comparación al grupo control (diferencia que fue estadísticamente significativa).

Si bien, no se encontró diferencia en los marcadores de daño a proteína (grupos carbonilo, reducción de NBT y ditirosinas), entre los grupos se pudo establecer que el grupo de sobrepeso y obesidad 1 se encontraban en estado de estrés oxidativo ya que presentan daño a lípidos y una disminución en las defensas antioxidantes.

Tabla 7. Marcadores plasmáticos de estrés oxidativo

Parámetro	control	sobrepeso	obesidad 1
MDA (μM)	4.1 \pm 0.4	6.0 \pm 0.5*	6.5 \pm 1.2*
NBT (nmol/ mg proteína)	6.3 \pm 0.5	7.3 \pm 0.6	7.7 \pm 0.6
Carbonilos (nmol osazonas/ mg proteína)	0.71 \pm 0.06	0.78 \pm 0.08	0.79 \pm 0.05
DT URF/ mg proteína	110.6 \pm 15.7	131.5 \pm 20.7	105.1 \pm 11.3
SH nmol/ mg protein	5.7 \pm 0.7	3.3 \pm 0.4*	3.6 \pm 0.7*

Análisis de varianza (ANOVA) con una prueba pos hoc de Bonferroni.
Los valores representan promedios \pm DE. *p<0.05 & CT.

7.2. Determinación de cambios químicos y estructurales en la insulina por estrés oxidativo.

Para demostrar que la insulina recombinante humana podía ser susceptible a modificaciones generadas por estrés oxidativo presente en sangre de mujeres obesas; la insulina recombinante humana fue expuesta a sangre del grupo control, sobrepeso y obesidad 1 (ver material y métodos) y se cuantificaron marcadores de daño a proteína presentes en la hormona.

Como se puede observar en la figura 3 y tabla 8, la insulina recombinante humana presentó una mayor concentración de grupos carbonilos después de su exposición a sangre de pacientes en sobrepeso y obesidad 1. Si bien, no fueron observadas diferencias estadísticas entre el grupo control y sobrepeso en el marcador de proteínas oxidadas (reducción de NBT), un incremento en este marcador fue observado en el grupo de obesidad 1 en comparación al grupo control. (figura 4, tabla 8). Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de esas sangres para modificar químicamente a la insulina.

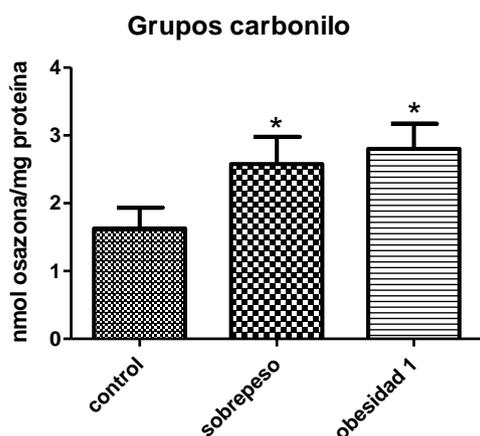


Figura 3. Grupos carbonilo cuantificados en insulinas expuestas a sangre de mujeres con sobrepeso y obesidad 1.

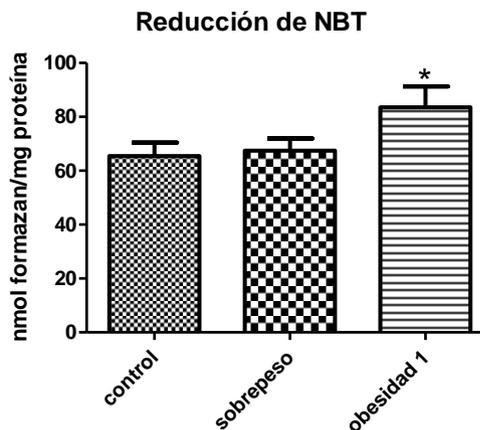


Figura 4. Reducción de NBT cuantificado en insulinas expuestas a sangre de mujeres con sobrepeso y obesidad 1.

Tabla. 8 Marcadores de daño a proteínas (insulina).

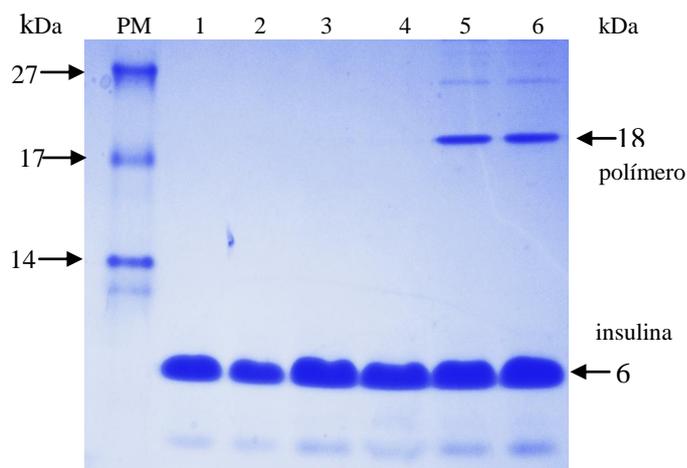
Parámetro	control	sobrepeso	obesidad 1
NBT (nmol de formazan/ mg proteína)	65.5 ± 4.9	67.5 ± 4.5	83.5 ± 7.8*
Carbonilos (nmol osazonas/ mg proteína)	1.63 ± 0.3	2.58 ± 0.4*	2.80 ± 0.4*

*p<0.05 & CT Análisis de varianza (ANOVA) con una prueba pos hoc de Bonferroni.
Los valores representan promedios ± DE.

De manera conjunta la insulina expuesta a sangre del grupo control, sobrepeso y obesidad 1 fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) no desnaturizante y su patrón electroforético fue analizado

Como se puede observar en la figura 5, el patrón electroforético de la insulina nativa (no expuesta a ningún tipo de sangre) presentó una banda de 6 kDa que corresponde al peso molecular de la hormona (carril 1) y el cual fue similar al patrón electroforético mostrado por la insulina incubada en agua (carril 2), sangre del grupo control y sobrepeso (carril 3 y 4). Interesantemente, el patrón electroforético obtenido de la insulina incubada en sangre de mujer obesa 1, además de presentar la banda característica de la hormona (6 kDa) mostró la aparición de una nueva banda proteica con un peso molecular de 18kDa (carril 5 y 6).

Fig. 5 Patrón electroforético de insulinas oxidadas.



Gel representativo (15%) de una electroforesis no desnaturizante. Acrilamida/bis-acrilamida teñido con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (PM), patrón electroforético de insulina nativa (carril 1), insulina incubada en agua (carril 2), insulina incubada en sangre control (carril 3), insulina incubada en sangre de paciente con sobrepeso (carriles 4) e insulina incubada en sangre de paciente con obesidad grado 1 (carriles 5 y 6).

Los resultados obtenidos del análisis electroforético demostraron que la insulina recombinante humana al ser expuesta a sangre del grupo control y sobrepeso presentaron cambios químicos que no repercutieron en su estructura sin embargo las insulinas expuestas a sangre de pacientes con obesidad 1 además de presentar cambios químicos, su patrón electroforético se vio modificado demostrando acomplejamiento de la hormona.

Debido a que se demostró cambios químicos y estructurales en la insulina expuesta a sangre de paciente obeso, nuestro siguiente objetivo era demostrar que estos cambios eran suficientes para modificar la funcionalidad de la hormona.

7.3. Evaluación de la funcionalidad de la insulina recombinante humana modificada por estrés oxidativo.

La actividad biológica o efecto hipoglicémico de la hormona fue evaluado administrando insulina que fue expuesta a sangre de los grupos en estudio y tomando como referencia la actividad de la hormona nativa o no expuesta a ningún tipo de sangre (ver material y métodos).

Como se observa en la figura 6, el efecto hipoglicémico obtenido con la insulina nativa (no oxidada) fue similar al efecto obtenido con la insulina incubada en sangre del grupo control e insulinas incubadas en sangre de pacientes con sobrepeso. Sin embargo la insulina incubada en sangre de pacientes con obesidad 1 presentó un menor efecto hipoglicémico en comparación con la insulina nativa e incubadas en sangre del grupo control y con sobrepeso.

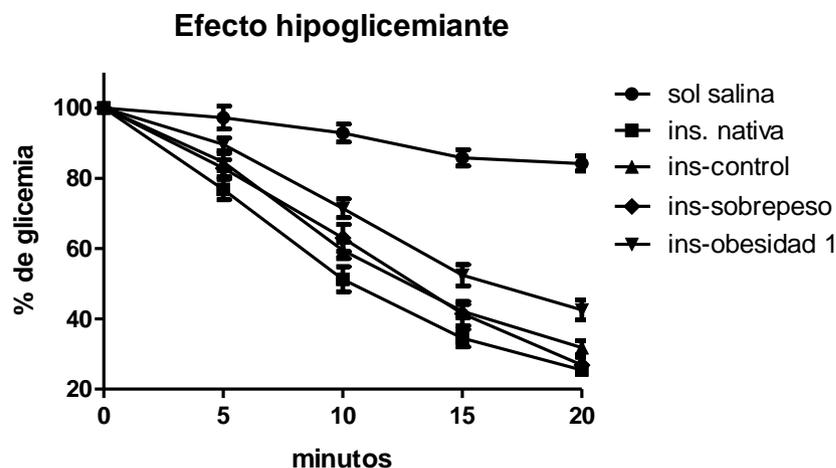


Fig. 6 Efecto hipoglicémico de insulina nativa y expuesta a sangre de grupo control, sobrepeso y

Estos resultados demostraron que la modificación química y estructural de la insulina (formación de complejos) inducidas por su exposición a sangre de pacientes con obesidad 1, contribuyen a la disminución de la funcionalidad de la hormona.

Para analizar de manera cuantitativa la disminución en la actividad biológica de la hormona se realizó un análisis del área bajo la curva de los efectos hipoglicemiantes. El análisis mostró que la insulina incubada en sangre de pacientes con obesidad 1 presentó una disminución de su funcionalidad del 18% (figura 7).

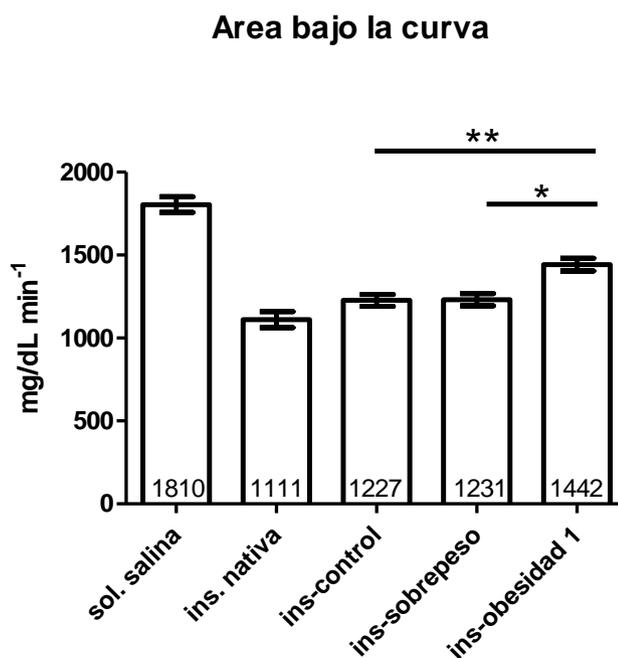
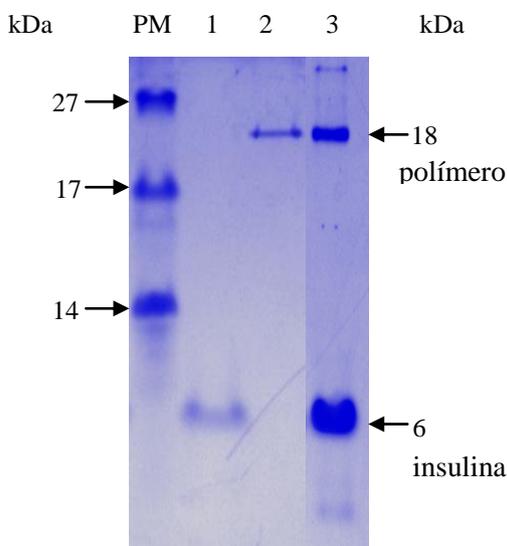


Fig. 7 Área bajo la curva del efecto hipoglicemiante de insulinas expuestas a sangre de mujeres control, sobrepeso y obesidad 1.

Debido a que se observó una disminución en la actividad de la insulina después de su incubación en sangre de paciente con obesidad 1, la cual correlaciona con la presencia de cambios estructurales (formación de complejos fig. 5). Se procedió a investigar si la formación de complejos estaba relacionada con la disminución del efecto hipoglicemiante. Para abordar esta pregunta se purificaron las bandas proteicas de insulina (6kDa y 18kDa) de geles no desnaturizantes y se evaluó su efecto hipoglicemiante.

La purificación de las bandas proteicas se realizó como se indica en material y métodos y se corroboró mediante electroforesis no desnaturalizante (gel al 15%). Como se observa en la figura 8 ambas proteínas fueron purificadas y fueron utilizadas para evaluar su actividad biológica por separado.

Fig. 8 Electroforesis de proteínas purificadas.



Electroforesis no desnaturalizante, gel al 15% acrilamida/bis-acrilamida. Marcador de peso molecular (PM), banda proteica purificada de 6kDa (carril 1), banda proteica de 18kDa (carril 2), patrón de insulina obtenido después de su incubación en sangre de paciente obesa 1 (carril 3).

Como se puede observar en la figura 9 el complejo de 18 kDa no mostró efecto hipoglicemiante, presentando un comportamiento similar a la administración de solución salina. Por otro lado, el efecto hipoglicemiante de la banda de 6 kDa fue mayor al efecto hipoglicemiante generado por la insulina nativa.

Estos resultados muestran que el acomplejamiento de la hormona generado por cambios químicos y estructurales inducidos por la incubación en sangre de pacientes con obesidad 1 podría ser un mecanismo de inactivación de la insulina

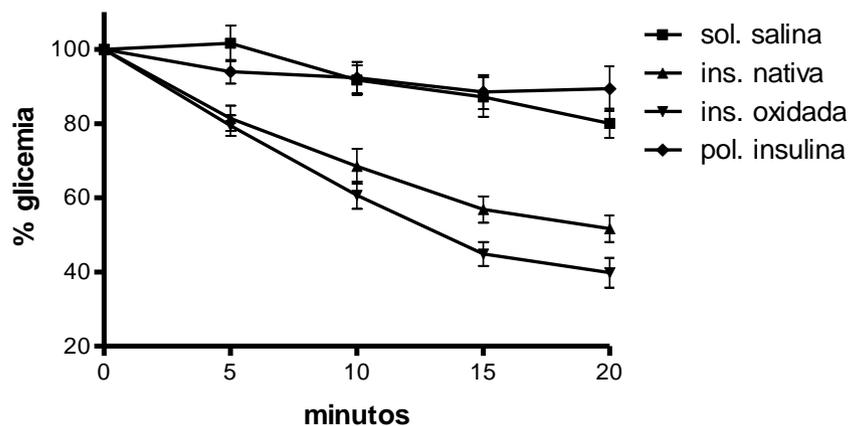


Fig. 9 Efecto hipoglicemiante de insulinas purificadas.

Por otro lado el análisis del área bajo la curva de los efectos hipoglicemiantes obtenidos, mostró que la insulina purificada (6kDa) presentó un efecto hipoglicemiante mayor en un 15% en comparación a la insulina nativa (figura 10).

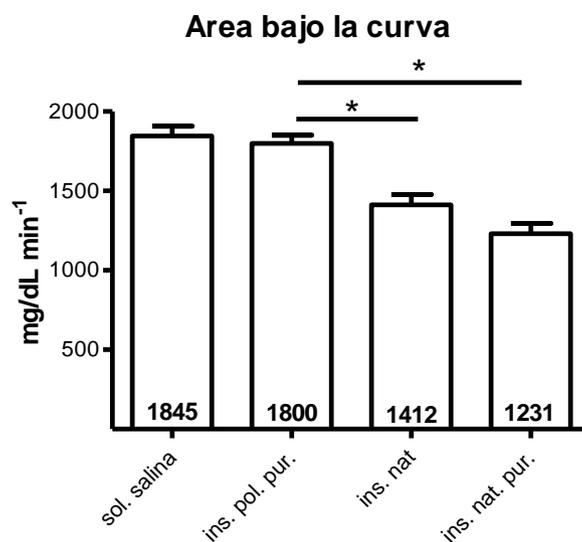


Fig. 10 Área bajo la curva del efecto hipoglicemiante de insulinas purificadas.

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo evaluó la capacidad oxidante que presenta la sangre de mujeres con sobrepeso y obesidad 1 sobre la insulina recombinante humana. Se comparó el estado metabólico de estrés oxidativo en un grupo de mujeres con sobrepeso y obesidad 1 con un grupo control (personas no obesas). El aumento en las concentraciones de Malondialdeído (producto final de lipoperoxidación) y la disminución de grupos sulfhidrilos totales (defensa antioxidante), mostró la presencia de estrés oxidativo en los grupos estudiados.^(Tinahones y col. 2009) El aumento en las concentraciones de MDA indicaban que los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los lípidos, estaban siendo susceptibles a oxidación por radicales libres; generándose productos de lipoperoxidación.^(Gago y col. 2007) Por otro lado la disminución de los sistemas antioxidantes en mujeres con sobrepeso y obesidad 1, Codoñer-Franch 2009 sugería su consumo, en el afán de evitar el daño a otras biomoléculas como las proteínas, que no presentaron daño oxidativo evidente.

Además los marcadores de daño a proteína cuantificados en las insulinas expuestas a sangre de pacientes con sobrepeso y obesidad 1 sugerían cambios químicos. El aumento de grupos carbonilo en los grupos estudiados sugirió la formación aductos; debido a que el Malondialdeído es capaz de modificar oxidativamente proteínas ricas en aminoácidos como lisina, cisteína e histidina,^(Dalle-Donne 2003) y en ambos grupos este producto de lipoperoxidación se encontró aumentado por lo tanto generó aductos con el grupo amino libre de la lisina (B29) y los grupos amino terminales de la cadena alfa y beta de la insulina. Estos resultados se reforzaban debido a que el aumento de las concentraciones plasmáticas de MDA correspondían con el aumento en los grupos carbonilo cuantificado en las insulinas expuestas a sangre de paciente con sobrepeso y obesidad 1 que cuantitivamente fué del 13%. Además las insulinas expuestas a sangre de pacientes con obesidad 1 presentaron aumento en las concentraciones de formazan, que se genera por hidroxilación de aminoácidos fenilalanina originando nuevas tirosinas que junto con las tirosinas ya presentes sufren una nueva hidroxilación formando grupos catecol que en presencia de metales de transición generan ortoquinononas que tienen la capacidad de reducir el nitroazul de tetrazolium (NBT) dando como producto formazan. Por lo tanto la insulina expuesta a sangre de paciente con obesidad 1 además de estar formando

aductos con MDA, presentó ataque directo de radicales libres ($\cdot\text{OH}$) y considerando lo reportado por Corichi y col. en 2005 los aminoácidos aromáticos Fen (B1,24,25) y Tir (A14,19) y (B16,26) de la insulina habían sido los mas susceptibles al ataque por radicales libres.

Ahora bien los cambios químicos eran evidentes pero no sugerían modificaciones estructurales de la hormona; pero el análisis electroforético mostró un acomplejamiento de la hormona únicamente en el grupo de obesidad 1, que estaría generándose por un lado por los mecanismos antes descritos (formación de aductos y quinonas) que estarían modificando la estructura secundaria de la hormona; aunado a la formación de radicales tiilo generados por rompimiento de puentes disulfuro intercatenarios Cis (A7-B7) y Cis (A20-B19) e intracatenarios Cis (A6-B11) y radicales tirosilo generados por ataque directo de radicales $\cdot\text{OH}$ a residuos de tirosina (A14,19) y (B16,26) y a tirosinas formadas por hidroxilación de fenilalaninas (B1,24,25) modificando la estructura terciaria de la hormona contribuyendo en la polimerización de la hormona.

Además la insulina expuesta a sangre de pacientes con obesidad 1 presentó una disminución del 18% de funcionalidad, sugiriendo que los cambios químicos y estructurales eran suficientes para modificar su función debido a que el sitio de unión de la insulina a su receptor incluye a los aminoácidos Fen (B24 y 25) y Tyr B16, (Mirmira y col. 1991) los cuales se comprometían durante la polimerización de la hormona, generando un mal acople de la insulina con su receptor y disminución de la función de la hormona. Esto se refuerza con estudios previos que refieren que la presencia de mutaciones en la hormona (Val A33-Leu, FenB24-Ser y FenB25-Leu) se han asociado con el desarrollo de Diabetes Mellitus ^{Bin Xu y col. 2004} además aunado con lo anterior la purificación del complejo puso de manifiesto la inactivación de la hormona al momento de acomplejarse, evidenciado por la pérdida total de su función al evaluar su efecto hipoglicemiante y mostró que el 18% de la insulina expuesta a sangre de paciente obeso 1 había formado complejos.

Por lo tanto la capacidad oxidante de la sangre de pacientes con sobrepeso es capaz de generar cambios químicos en la insulina que no son suficientes para modificar su estructura y función. Si se considera que estos cambios pueden revertirse eliminando el agente causal (estrés oxidativo), se tomaría como ventaja en

el manejo, control y tratamiento de estos pacientes, considerando que el sobrepeso es paso previo a la obesidad 1; que presentan capacidad oxidante suficiente para generar cambios químicos y estructurales irreversibles, suficientes para modificar la funcionalidad de la hormona, siendo la formación de polímeros un mecanismo evidente de inactivación de la hormona que estaría contribuyendo con los cambios metabólicos (resistencia a la insulina ^{Mohammed y col.}) y complicaciones (dislipidemias, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus tipo 2 ^{Dandona y col. 2005}) que se presentan en esta patología.

Ahora bien si la modificación de proteínas por ERO esta involucrada en la causa y progresión de múltiples desordenes fisiológicos y patológicos ^(Palacio y col. 2006); y en la insulina fue el agente causal de inactivación por acomplejamiento, es necesario establecer medidas terapéuticas (dieta, ejercicio, antioxidantes) que mejoren el estado metabólico de estrés oxidativo y buscar un método de diagnóstico temprano que nos permita detectar a las personas que estén generando acomplejamiento de la hormona y por lo tanto inactivación de la misma.

IX. PERSPECTIVAS

Estos resultados sugieren por primera vez, la existencia de un posible mecanismo de inactivación de la insulina que pudiera estar presente en personas, además abre la posibilidad de buscar la presencia de estos complejos en personas obesas y determinar si este complejo tiene la capacidad de interactuar con su receptor.

X. BIBLIOGRAFÍA.

Aebi HE. Catalase, In:Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 1982.

Amici A, Levine RL, Stadtman ER. Conversion of amino acids residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. *J Biol Chem.* 264:3341-3346, 1989.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48(1):1-9,1999.

Bestervelt LL, Vaz AND, Coon MJ. Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isoenzymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(9):3764-3768, 1995.

Bhatia S, Shukla R, Venkata Madhu S, Kaur Gambhir J, Madhava Prabhu K. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 36(7); 557-562, 2003.

Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 13(2):233-244,1999.

Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Blocker H, Gross G, Kiess M, Kloppel KD, Maiorino M, Roveri A, Schuckelt R, Ursini F, Wingender E, Flohé L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA and deduced aminoacid sequence. *J Biol Chem* 269(10):7342-7348, 1994

Burk RF. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 5(9):2274-2279, 1991.

Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 26(5):1589-1596, 2003.

Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 268(4):2571-2576, 1993.

Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH, Doan K, Liu XF. Expression of plasma glutathione peroxidase in human liver in addition to kidney, heart, lung and breast in human and rodents. *Blood* 79(12):3233-3238, 1992.

Chu FF, Esworthy RS. The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHP-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* 323(10):288-294, 1995.

Cohen MS, Bradley E, Britigan D, Hassett J, Rosen GM. Phagocytes, O₂ reduction, and hydroxyl radical. *Rev Infect Dis* 10(6):1088-1096, 1988.

Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD, Small M. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes*. 4(8):909-991,1992.

Creeth JM, Cooper B, Donald ASR, Clamp JR. Studies of the limited degradation of mucous glycoprotein. *Biochem J*. 211(2):323-332, 1983.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 329(1-2):23-38,2003.

Davies KJ, Delsignore ME, and Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 262(20):9902-9907, 1987.

Davies KJ, Lin SW, and Pacifici RE. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* 262(20):9914-9920,1987.

Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J Biol*

Chem 262(20):9895-9901, 1987.

Davies MJ, Gilbert BC, Haywood RM. Radical-induced damage to bovine serum albumin: role of the cysteine residue. *Free Radic Res Commun*. 18(6):353-67, 1993.

Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med*. 11(2):161-168,1991.

Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Xanthine Oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes. Protección por Allopurinol. *Diabetes*. 51:1118-1124, 2002.

Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes. *Diabetes* 51:1118-1124,2002.

Farías, G. Hormonas. En Química Clínica. G. Farías M. Cap. 31;714-758. Manual Moderno. 1999.

Ferdinandy P, Schulz R. Inhibition of peroxynitrite-induced dityrosine formation with oxidized and reduced thiol, nitric oxide donors, and purine derivatives. *Antioxid Redox Signal*. 3(1):165-171,2001.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW Degan P, Ames B. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(2):4533-453, 1990.

Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal: formation of cross-linked protein which inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem*. 269(34):21639-21643,1994.

Gebicki S, Gebicki MJ. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to

oxygen free radicals. *Biochem J* 289(Pt 3):743-749,1993.

Giese SP, Simpson JA, Charlton TS, Duncan MW, Dean RT. Protein-bound 3,4 dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry* 32(18):4780-4786, 1993.

Giulivi C, Traaseth NJ, Davies KJ. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids*. 25(3-4):227-232,2003.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53(1):S110-S118, 2004.

Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc* 147:332-351, 1934.

Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-14, 1990.

Hicks JJ and Medina-Navarro R. Inhibitory Capacity of Human serum on Induced Microsomal Lipoperoxidation. *Archives of Medical Research* 26:169-172, 1995.

Hill KE, Lyons PR, Burk RF. Differential regulation of rat liver selenoprotein mRNAs in selenium deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 185:260-263, 1992.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 88(2):E14-E22, 2001.

Ho YS, Howard AJ, Crapo JD. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4(3):278-286, 1991.

Hodges GR, Marwaha J, Paul T, Ingold KU. A novel procedure for generating both nitric oxide and superoxide in situ from chemical sources at any cosen mole ratio. First application: tyrosine oxidation and a comparison with preformed peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 13(12):1287-93, 2000.

Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 101(10):541-551,2000.

Jiang F, Drumond G, Dusting G. Suppression of oxidative stress in the endothelium and vascular wall. *Endothelium*. 11(2):79-88, 2004.

Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Report* 6(4):229-234, 2001.

Kristal BS, Yu BP. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol*. 44:B107-B114,1992.

Lehrer SS, Pasman GD. Ultraviolet Irradiation Effects in Poly-L-tyrosine and Model Compounds. Identification of Bityrosine as a Photoproduct. *Biochemistry*. 6(3):757-767,1967.

Lenzed S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with varios other mouse tissue. *Free Radic Biol Me* 20(3):463-466, 1996.

Luczaj W and Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mor Biol Lett* 8(2):391-413, 2003.

Maddipati KR, Marnett LJ. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem* 262(36):17398-17403, 1987.

Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chem Acta*. 126(1):41-51, 1982.

Marklund SL, Karlsson K. Extracellular-superoxide dismutase, distribution in the body and therapeutic applications. *Adv Exp Med Biol* 264:1-4, 1990.

Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79(24):7634-7638, 1982.

Medina Navarro R. y Hicks JJ. Radicales libres de oxígeno: bioquímica inorgánica y biomedicina. En Bioquímica JJ Hicks. McGraw-Hill, Cap 40;779-793, 2001.

Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 173(3):932-939,1990.

Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. Manual Moderno 15ª edición, pp1041, 2001.

Nadkarni DV, Sayre LM. Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol*. 8(2):284-291, 1995.

Nakashima H, Yamamoto M, Goto K, Osumi T, Hashimoto T, Endo H. Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene* 79(2):279-288, 1989.

Neuzil J, Gebicki JM, Stocker R. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem J*. 293(Pt 3):601-606,1993.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Yamagishi, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 404(6779):787-790, 2000.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related Changes in Oxidized Proteins. *J Biol Chem* 262(12):5488-5491, 1987.

Ortega-Camarillo C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of Gonadotrophin (PMSG) by Oxygen Free Radicals Alters Its Structure and Hormonal Activity. *Mol. Reprod. Dev* 52:264-268,1999.

Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest.* 107(7): 853-860, 2001.

Prakash M, Upadhy S, Prabhu R. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uraemia. *Scand J Clin Lab Invest.* 64(6):599-604, 2004.

Reznick, A. Z., Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in Enzymology* 23:357-363, 1994.

Rizvi SI, Zaid MA. Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of insulin and (-)epicatechin. *J Physiol Pharmacol* 52(3):483-488, 2001.

Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione preoxidase of rats testis. *J Biol Chem* 267:6142-6146, 1992.

Saika K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300(1):216-222,2003.

Schuckelt R, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strabburger W, Ursini F, Wolf B, Flohé L. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free Rad Res Commun* 14(5-6):343-361, 1991.

Sohal RS, Svensson I, Sohal BM, Brunk TU. Superoxide anion radical production in different animal species. *Mech Ageing Dev* 49(2):129-135, 1989.

Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets of redox signaling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 45(4):476-494, 2002.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanisms and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9(4):315-325, 1991.

Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Rabinovitch A. Destruction of rat pancreatic islet β -cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology* 137(12):5290-5296, 1996.

Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306:284-287, 1983.

Takahashi K, Avissar N, Whithin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256(2):677-686, 1987.

Uchida K, Kato Y, Kawakishi S. A novel mechanism for oxidative damage of prolyl peptides induced by hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun*. 169(1):265-271, 1990.

Uchida K, Kawakishi S. 2-oxohistidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *FEBS Lett*. 332(3):208-210, 1993.

Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radical Biol Med* 18:93-105, 1995.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 245(1):243-250, 1987.

