

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES
EN LA DIABETES : IMPORTANCIA DE LA XANTINA
OXIDASA E IMPLICACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR-KB

MARCO ROMAGNOLI

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan Francisco Ascaso Gimilio
- D^a. Fiorella Bassi
- D. Umberto M. Marinari
- D^a. M^a Alicia López Yeste
- D. Francisco Javier Miranda Alonso

Va ser dirigida per:

D. José Viña Ribes

D^a. María Carmen Gómez Cabrera

©Copyright: Servei de Publicacions
Marco Romagnoli

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6994-4

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

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA
Y EL DEPORTE

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE RADICALES
LIBRES EN LA DIABETES:
IMPORTANCIA DE LA XANTINA OXIDASA E
IMPLICACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR- κ B**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Marco Romagnoli

Dirigida por:

Prof. Dr. José Viña Ribes

Prof. Dra. M^a Carmen Gómez Cabrera

Valencia, 2007

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA



**MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE RADICALES
LIBRES EN LA DIABETES:
IMPORTANCIA DE LA XANTINA OXIDASA E
IMPLICACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR- κ B**

TESIS DOCTORAL presentada para la obtención del
grado de doctor en Ciencias de la Actividad Física y el

Deporte

D. MARCO ROMAGNOLI

AÑO 2007



FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof. **D. José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dra. **M^a Carmen Gómez Cabrera**, Profesora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. Marco Romagnoli, Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte por la Universidad de Milán, título homologado por el Ministerio en España, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada.

**“MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE RADICALES
LIBRES EN LA DIABETES: IMPORTANCIA DE LA
XANTINA OXIDASA E IMPLICACIÓN DEL
FACTOR NUCLEAR- κ B”**

para la obtención del título de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 28 de Marzo de 2007

Fdo. Prof. D. José Viña Ribes

Fdo. Dra. M^a Carmen Gómez Cabrera

**A MIS PADRES
A “ANTO”**

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1-97
1. DIABETES MELLITUS. NOCIONES BASICAS.	
1.1. Concepto y generalidades.....	1
1.2. Clasificación de la diabetes mellitus.....	4
1.3. Diagnóstico de la diabetes	6
1.4. Epidemiología. Importancia sociológica.....	7
1.5. Patogenia.....	7
1.5.1. Diabetes de tipo I	7
1.5.2. Diabetes Mellitus tipo II.....	9
1.6. Manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus.....	10
1.6.1. DM tipo 1.....	10
1.6.2. DM tipo 2.....	11
1.7. Complicación de la diabetes mellitus.....	12
1.7.1. Complicaciones agudas de la diabetes.....	12
1.7.2. Complicaciones crónicas de la diabetes.....	13
1.8. Tratamiento de la diabetes mellitus.....	16
2. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.	
2.1. Introducción. Metabolismo aerobio.....	17
2.1.1. Concepto de radical libre.....	18
2.1.2. Mecanismos generadores de radicales libres...	18
2.2. Tipos de radicales libres.....	19
2.2.1. Radical libres de oxígeno (ERO).....	19

2.2.2. Radicales libres de nitrógeno (ERN).....	22
2.3. Fuentes de radicales libres.....	27
2.3.1. Fuentes exógenas.....	27
2.3.2. Fuentes endógenas.....	28
2.4. Daño biomolecular como consecuencia del estrés oxidativo.....	38
2.4.1. Daño oxidativo a las proteínas.....	38
2.4.2. Daño oxidativo a los lípidos.....	41
2.4.2.1. Los oxisteroles.....	42
2.4.3. Daño oxidativo a los glúcidos.....	44
2.4.4. Daño oxidativo al DNA.....	45
2.5. Sistemas de defensa frente a los radicales libres.....	46
2.5.1. Generalidades.....	46
2.5.2. Los antioxidantes fisiológicos más destacables.....	49
2.6. Estrés oxidativo. Concepto.....	60
2.7. Indicadores de estrés oxidativo producido por radicales libres.....	60
2.7.1. Estatus del glutatión.....	60
2.7.2. Malondialdehído.....	61
2.7.3. Pentano y etano en el aire espirado.....	61
2.7.4. 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina.....	62
2.7.5. Determinación de grupos carbonilos en proteínas.....	62
2.7.6. Determinación de Orto-Tirosina.....	63
2.7.7. Peróxido de hidrógeno en aire espirado.....	63
2.8. Patologías relacionadas con los radicales libres.....	63

3. ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS.

Generalidades.....	64
Fuentes de producción de radicales libres durante la diabetes.....	64
3.2.1. Papel de la hiperglucemia.....	67
3.2.2. Papel de la xantina oxidasa.....	71
3.2.3 Papel de la óxido nítrico sintasa (NOS).....	77
3.2.4 Papel de la ciclooxigenasa (COX).....	81
3.2.5. Otras fuentes de radicales libres en la diabetes.....	82

4. NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NF-κB)

4.1. Generalidades.....	83
4.2. Componentes del NF-κB.....	84
4.3. Activación del NF-κB.....	88
4.3.1. Agentes inductores NF-κB.....	88
4.3.2. Genes regulados por NF-κB.....	90

5. INFLAMACIÓN

6.1. Generalidades.....	93
6.1.1. Biología de las citocinas.....	93
6.2. Principales citocinas, nomenclatura y función biológica.....	94

II. OBJETIVOS

98-99

III. MATERIAL Y MÉTODOS 100-134

1. MATERIAL.

- 1.1. Sustrato Biológico.....100**
 - 1.1.1. Ratas.....100**
- 1.2. Aparatos.....101**
- 1.3. Reactivos.....103**

2. MÉTODOS.

- 2.1. Diabetización de las ratas.....104**
- 2.2. Administración de alopurinol.....105**
- 2.3. Obtención y procesado de las muestras.....105**
- 2.4. Método para determinar la concentración de proteínas:
Método Bradford.....106**
- 2.5. Extracción de proteínas nucleares a partir de
hígado.....107**
- 2.6. Extracción de proteínas citoplasmáticas a partir de
hígado.....108**
- 2.7. Determinación de los valores de glutatión
total.....109**
- 2.8. Determinación del glutatión oxidado
(GSSG).....113**
- 2.9. Determinación de lipoperóxidos en forma de
malondialdehído.....115**
- 2.10. Determinación de hemoglobina.....116**
- 2.11. Determinación de la actividad de xantina oxidasa /
xantinadeshidrogenada.....118**

2.12.	Estudio de la expresión de I κ B- α , NF- κ B, fosforilación de I κ B- α , IKK β y de la fosforilación de iNOS y COX2 mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) y posterior Western Blotting.....	122
2.13.	Estudio de la oxidación de proteínas de hígado.....	127
2.14.	Determinación de la actividad alanino amino transferasa en plasma (ALT).....	130
2.15.	Evaluación histológica de la necrosis hepática.....	131
2.16.	Evaluación histoquímica del número de neutrófilos.....	132
2.17.	Evaluación de GRO/CINC-1, IL-6, IL-1 β por ELISA.....	132
2.18.	Extracción de oxisteroles y análisis mediante cromatografía de gases.....	133
3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.....	134

IV. RESULTADOS

135-171

1. MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS EN DOS MODELOS, DE DISTINTA DURACIÓN, DE DIABETES EXPERIMENTAL EN ANIMALES.

- 1.1. Parámetros urinarios: glucosuria.....135**
- 1.2. Parámetros hematológicos.....136**
 - 1.2.1. Valores de alanina-aminotransferasa (alt) en plasma de rata.....136**
 - 1.2.2. Valores de hemoglobina glicosilada.....137**
- 1.3. Evolución del peso corporal de los animales.....138**
- 1.4. Parámetros histológicos.....140**
 - 1.4.1. Determinación de la necrosis hepática. Tinción de hematoxilina-eosina.....140**
 - 1.4.2. Determinación de la infiltración de neutrófilos a nivel hepático.....141**
 - 1.4.3. Determinación de las interleucinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1.....143**

2. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A DOS MODELOS, DE DISTINTA DURACIÓN, DE DIABETES EXPERIMENTAL EN ANIMALES

- 2.1.** Efecto de la administración de alopurinol en el estatus de glutatión sanguíneo.....**146**
- 2.2.** Efecto de la administración de alopurinol sobre el estatus de glutatión hepático.....**148**
- 2.3.** Efecto de la administración de alopurinol sobre los niveles de MDA en plasma.....**149**
- 2.4.** Efecto de la administración de alopurinol sobre los niveles de MDA en hígado.....**151**
- 2.5.** Efecto de la administración de alopurinol sobre actividad de la enzima xantina oxidasa en plasma de rata.....**153**
- 2.6.** Efecto de la administración de alopurinol sobre actividad de la enzima xantina oxidasa en hígado de rata.....**154**
- 2.7.** Efecto de la administración de alopurinol sobre la oxidación de proteínas en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....**156**
- 2.8.** Efecto de la administración de alopurinol sobre los niveles de oxisteroles en hígado de rata. Modelo a corto y largo plazo.....**158**

3. IMPLICACIÓN DE NF- κ B y LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN EN LA DIABETES MELLITUS INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

- 3.1** Fosforilación de IKK- β en extractos citosólicos de hígado de animales diabéticos durante 12 días. Papel de la xantina oxidasa.....**162**
- 3.2** Expresión de I κ b- α en extractos citosólicos de hígado de animales diabéticos durante 12 días. Papel de la xantina oxidasa.....**163**
- 3.3** Fosforilación de I κ b- α en extractos citosólicos de hígado de animales diabéticos durante 12 días. Papel de la xantina oxidasa.....**165**
- 3.4** Traslocación al núcleo de NF- κ B en hígado de animales diabéticos durante 12 días. Papel de la xantina oxidasa.....**166**
- 3.5** Expresión de iNOS y COX2 en extractos citosólicos de hígado de animales diabéticos durante 28 días. papel de la xantina oxidasa.....**168**
- 3.6** Expresión de α -tubulina en extractos citosólicos de hígado de rata.....**170**

V. DISCUSION	172-198
1.- ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES EXPERIMENTAL	
1.1. Oxidación del glutatión.....	172
1.2. Niveles de lipoperóxidos.....	174
1.3. Proteínas oxidadas.....	175
1.4. Oxisteroles	176
2.- DAÑO HEPÁTICO Y DIABETES.....	179
3.- DIABETES E INFLAMACIÓN.....	181
4.- MECANISMOS DE GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES EN LA DIABETES. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.	184
4.1. Origen de la xantina oxidasa en los modelos de diabetes experimental inducida con estreptozotocina.	187
4.2. Efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad xantina oxidasa en dos modelos de diabetes experimental.....	188
4.3. Efecto de la administración de alopurinol sobre el estrés oxidativo asociado a dos modelos de diabetes experimental.....	190

4.4. Efecto de la administración de alopurinol sobre la inflamación y el daño hepático asociado a dos modelos de diabetes experimental..... **191**

4.5. Efecto de la administración de alopurinol y otros antioxidantes sobre las complicaciones asociadas a la diabetes y los parámetros diagnósticos de la enfermedad.....**195**

VI. CONCLUSIONES **199-201**

VII. CONCLUSIONI **202-203**

VIII. BIBLIOGRAFÍA **204-239**

ÍNDICE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitas.....	4
Tabla I.2. Características generales de la diabetes DM tipo 1 y DM tipo 2.....	11
Tabla I.3. Principales clases de ERO.....	20
Tabla I.4. Principales especies de ERN.....	24
Tabla I.5. Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas.....	39
Tabla I.6. Óxido nítrico sintasas (NOS).....	79
Tabla I.7. Selección de agentes inductores de la activación de NF- κ B.....	90
Tabla I.8. Selección de genes regulados por NF- κ B.....	91

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla III.1. Descripción de los anticuerpos utilizados para western blotting.....	125
------------------------------------------------------------------------------------------	------------

IV. RESULTADOS

Tabla IV.1. Concentración de glucosa en orina	136
Tabla IV.2. Análisis de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1 en plasma de rata. Modelo a corto plazo.....	144
Tabla IV.3. Análisis de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1 en plasma de rata. Modelo a largo plazo.....	144
Tabla IV.4. Análisis de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1 en plasma de rata. Modelo a largo plazo.....	145
Tabla IV.5. Análisis de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1 en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	145
Tabla IV.6. % Fracción molar de oxisteroles en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	159
Tabla IV.7. % Fracción molar de oxisteroles en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	159
Tabla IV.8. Porcentaje de oxisteroles totales respecto al colesterol en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	160
Tabla IV.9. Porcentaje de oxisteroles totales respecto al colesterol en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	160

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONI

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial	29
Figura I.2. Mecanismo de peroxidación lipídica.....	41
Figura I.3 Óxidos del colesterol: Oxisteroles.....	44
Figura I.4. Estructura química del Glutatión.....	49
Figura I.5. Ciclo redox del glutatión.....	52
Figura I.6. Producción N-carboximetil lisina	66
Figura I.7. Oxidación de la glucosa y producción de oxidante.....	67
Figura I.8. Generación de ERO en la hiperglucemia.....	68
Figura I.9. Posible relación entre estrés oxidativo inducido por hiperglucemia y complicaciones diabéticas.....	70
Figura I.10a. Estructura tridimensional de la XOR.....	73
Figura I.10b. Orientación relativa de los dominios.....	73
Figura I.11. La XOR cataliza la producción de NO y peroxinitrito.....	76
Figura I.12. Generación y dimerización del complejo NF- κ B/Rel/ I κ B en el citoplasma celular	85
Figura I.13. Interacción de NF- κ B con su proteína inhibidora I κ B.....	86

Figura I.14. Clases de genes regulados por NF- κ B.....	87
Figura I.15. Agentes inductores NF- κ B.....	89
Figura I.16. Familia NF- κ B y proteínas inhibidoras κ B (I κ B).....	91

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura III.1. Esquema de la técnica del western blotting..	126
-------------------------------------------------------------------	------------

IV. RESULTADOS

Figura IV.1. Valores de alanina-aminotransferasa en plasma de rata. Modelo a corto plazo	137
Figura IV.2. Valores de hemoglobina glicosilada en plasma de rata. Modelo a corto plazo.....	138
Figura IV.3. Evolución de los pesos en los animales.....	139
Figura IV.4. Determinación de la necrosis hepática en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	141
Figura IV.5. Determinación de la infiltración de neutrófilos en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	142
Figura IV.6 Determinación de la infiltración de neutrófilos en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	143

Figura IV.7. Cociente (gssg/gsh) x 100 en sangre de rata. Modelo a corto plazo.....	147
Figura IV.8. Cociente (gssg/gsh) x 100 en sangre de rata. Modelo a largo plazo.....	147
Figura IV.9. Cociente (gssg/gsh) x 100 en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	149
Figura IV.10. Cociente (gssg/gsh) x 100 en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	150
Figura IV.11. Niveles de lipoperóxidos en plasma de rata. Modelo a corto plazo.....	150
Figura IV.12. Niveles de lipoperóxidos en plasma de rata. Modelo a largo plazo.....	151
Figura IV.13. Niveles de lipoperóxidos en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	152
Figura IV.14. Niveles de lipoperóxidos en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	152
Figura IV.15. Actividad xantina oxidasa en plasma de rata. Modelo a corto plazo.....	153
Figura IV.16. Actividad xantina oxidasa en plasma de rata. Modelo a largo plazo.....	154
Figura IV.17. Actividad xantina oxidasa en hígado de rata. Modelo a corto plazo.....	155
Figura IV.18. Actividad xantina oxidasa en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	155
Figura IV.19. Proteínas oxidadas en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....	157

Figura IV.20. p-IKK β en extractos citosólicos de hígado de rata. Modelo a corto plazo..... **163**

Figura IV.21. Ikb- α en extractos citosólicos de hígado de rata. Modelo a corto plazo.....**164**

Figura IV.22. p-Ikb- α en extractos citosólicos de hígado de rata. Modelo a corto plazo.....**165**

Figura IV.23. NF- κ B (p65) en extractos nucleares de hígado de rata. Modelo a corto plazo.....**167**

Figura IV.24. Expresión de iNOS en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....**169**

Figura IV.25. Expresión de COX2 en hígado de rata. Modelo a largo plazo.....**170**

Figura IV.26. Western blot representativo de α -tubulina en extractos citosólicos de hígado de rata. Modelo a corto.....**171**

V. DISCUSIÓN

Figura V.1. Modelo propuesto del papel de los radicales libres derivados de la xantina oxidasa en el daño hepático en animales diabéticos.....**194**

VI. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONI

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADP: Adenosín-5'-difosfato.

ADPI: Adenosín difosfato libre

AGE: Advance Glycation Endproducts

Alopurinol: 4-hidroxi pirazolo(3,4-d) pirimidina.

ALT: Alanino Amino Transferasa.

AMP: Adenosín-5'-monofosfato.

AMPc: Adenosín-5'-monofosfato cíclico

APS: Persulfato amónico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

AST: Aspartato Amino Transferasa.

ATP: Adenosín-5'-trifosfato.

BM: Biogénesis mitocondrial

BSA: Albúmina Suero Bovino.

CDNB: Cloro dinitrobenceno.

CHES: 2-(N-hidroxietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

COX: Ciclooxygenasa.

CPT-1 carnitina palmitoiltransferasa-1

Cu,Zn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc.

DEPC: Dietil pirocarbonato

DG: Diabetes gravídica

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

DTT : DL-Ditiotreitol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGTA: Etileno glicol-bis (aminoetil eter)- N,N,N',N'- ácido tetracético.

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

FAD: Flavín adenín dinocluótido.

FDNB: 1-fluor-2,4dinitrobenceno.

Fe-SOD: Superóxido dismutasas dependientes de hierro.

γ -Glu-Glu: γ -glutamilglutamato.

GAPDH: Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa.

GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa.

GGT: γ -Glutamil-transpeptidasa.

GMPc: Guanosina monofostato cíclico.

GOT: Glutámico-Oxalacético-Transaminasa.

GPA: glucosa plasmática ayunas

GS: Glutación sintetasa.

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HbA1c: hemoglobina glicosilata

HDL: High Density Lipoprotein

HEPES: N-(2-hidroxi-etil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico).

HOCl: Ácido hipocloroso.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HSP: Proteína de estrés térmico.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico.

IMP: Inosina monofosfato.

IL 6: interleuquina 6

IL1 β : interleuquina 1 beta

IKb: inhibidor I kappa β .

Kd: Kilodalton.

KOH: Hidróxido potásico.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LDL: Low Density Lipoprotein

L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil éster.

LPS: Lipopolisacárido.

MAPK: Proteín kinasas activadas por mitógenos.

MCAD :cadena media de acyl-coA deshidrogenasa

MDA: Malondialdehído.

MET: Metabolic equivalent tasks.

mmHg: Milímetros de mercurio.

Mn-SOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

MOPS: Ácido propano sulfónico.

MPP: Peptidasa procesadora mitocondrial

mtADN: ADN mitocondrial.

NAC: N-acetilcisteína.

NAD: Nictotinamida adenin dinucleótido.

NEM: N-etilmaleimida.

NF-κB: Factor Nuclear kappa B.

NO[•]: Óxido nítrico.

NO₂[•]: Radical nitrógeno dióxido

NO₂Cl: Cloro nitrilo.

NOS: Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal)

O₂: Oxígeno singlete.

O₂^{•-}: Anión superóxido.

OH[•]: Radical hidroxilo.

ONOO⁻: Peroxinitrito.

OR: Óxidoreductasa.

8oxodG: 8-hidroxi-2' deoxiguanosina:

p/v: peso/volumen.

PBS: Fosfato tampón salino.

PC: Fosfocreatina.

PDTC: Pirrolidin ditiocarbamato.

PI3K: fosfatidilinositol 3'kinasa

PFK: Fosfofructoquinasa.

PKC: Protein Kinasa C.

PLA₂: Fosfolipasa A₂.

PMSF: Fenil metil sulfonil fluoride.

RL: Radicales libres.

ROO•: Radical peroxilo.
RPE: Resonancia Paramagnética de electrones.
Rpm: Revoluciones por minuto.
SDS: Sodio dodecil sulfato
Se: Selenio.
Ser: Serina.
sGC: Guanilato ciclasa soluble
SOD: Superóxido dismutasa.
Sp1: Factor de transcripción selectivo del promotor 1
TBA: Ácido tiobarbitúrico.
TBS: Tris tampón salino.
TBS-T: Tris Tampón Salino con Tween 20
TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnetilenodiamina.
Tir: Tirosina.
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
Tr : Treonina.
TRIS: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.
Tween 20: Polioxietileno sorbitan monooleato.
UCP: Uncoupling Protein
UI: Unidades internacionales.
VM: Volumen minuto
XDH: Xantina deshidrogenasa.
XO: Xantina oxidasa.
XOR: Xantina oxidoreductasa.

I-INTRODUCCIÓN

I-INTRODUCCIÓN

1- DIABETES MELLITUS. NOCIONES BÁSICAS.

1.1.- CONCEPTO Y GENERALIDADES.

El término diabétes procede dal griego diabétes, que a su vez deriva dal verbo *diabaíno* “caminar”, formado a partir del prefijo *dia-*, “a traves de”, y *báino*, “andar, pasar”.

A lo largo del siglo XVIII y XIX el concepto de *diabetes* era un tanto impreciso, pues el término se utilizaba con varios sentidos; en primer lugar, se aplicaba de forma genérica para designar toda expulsión abundante de orina, sin importar el estado químico del líquido excretado ni atender a otros síntomas concomitantes; en este sentido, la palabra *diabetes* se usaba como sinónimo de *poliuria*.

Manuel Hurtado de Mendoza (1840) ofrece en su diccionario: Se designa con este nombre una enfermedad caracterizada por un aumento considerable y alteración manifiesta en la secreción de orina, acompañada de sed viva y enflaquecimiento progresivo.

Otro testimonio lexicográfico que nos puede ilustrar sobre los problemas de la terminología relativa a la diabetes es el *Diccionario de medicina y cirugía*, de Antonio Ballano (1817), que incluye la definición de esta enfermedad ofrecida por F. Sauvages en su sistema nosológico (1765), afirma Ballano: “Bajo este nombre comprehende Sauvages los fluxos de orina, en que se evacua inmediatamente toda la bebida, y aún más, con extenuacion, calentura lenta y sed insaciable.” Junto a esta especie, Ballano, siguiendo la doctrina de Sauvages, recoge otras seis especies más: *diabetes inglesa sacarina*, *diabetes histérica*, *diabetes artificial*, *diabetes por el abuso del vino y licores*

espirituosos, diabetes artrítica y diabetes febricosa. La primera de ellas es la *diabetes mellitus*, (DM) término acuñado por el médico inglés Thomas Willis en 1674 y que designa una variante de la diabetes en la que, según Ballano, la orina, a primera vista, tiene color claro, pero mirada con atención se percibe un matiz amarillento, «lo que hace habérsela comparado con mucha razón á una disolución de miel en una gran proporción de agua. La orina por lo general es más ó menos dulce al paladar». El término *diabetes mellitus* ha permanecido en inglés hasta nuestros días, y por influencia de esta lengua, ha entrado en el castellano con gran vigor, desplazando a las traducciones clásicas españolas *diabetes sacarina* y *diabetes azucarada*. Otros términos que empezaron a circular en la literatura europea de los siglos XVIII y XIX para designar diversos tipos de la enfermedad fueron *diabetes con exceso de urea* —que se corresponde con la *diabetes insípida*, *diabetes con materias grasas* que equivale a la *diabetes láctea* o *diabetes quilosa* de otros autores, caracterizada por la presencia de materia grasa y lechosa en la orina, *diabetes cerebral*, *diabetes gotosa*, *diabetes sifilítica*, *diabetes intermitente*, *diabetes aguda*, *diabetes crónica*, *diabetes pancreática*, *diabetes azotúrica*, *diabetes hidrotúrica*, etc. Muchos de estos términos designaban dolencias que nada tienen que ver con la diabetes tal como se entiende actualmente. Las anteriores definiciones de Hurtado de Mendoza y de Ballano contrastan con el concepto actual de diabetes, que recoge los descubrimientos fisiológicos y patológicos que tuvieron lugar principalmente durante el último cuarto del siglo XIX y la primera mitad del XX, protagonizados por P. Langerhans, O. Minkowsky, F. Banting y C. Best, estos dos últimos ganadores del Premio Nobel en 1923 por su descubrimiento de la insulina, pieza clave en la comprensión y tratamiento actual de la enfermedad. Hoy se sabe que la forma principal de diabetes (la diabetes «por antonomasia», es

decir, la diabetes sacarina) es una alteración del metabolismo que se debe a una deficiencia en la secreción o acción de la insulina, lo que condiciona la elevación de la concentración de glucosa en la sangre (hiperglucemia) y la propensión al desarrollo de complicaciones vasculares y neuropáticas. Esta definición incluye el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, que estaba ausente del concepto antiguo.

La diabetes mellitus comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética, factores ambientales y elecciones respecto al modo de vida. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden comprender una disminución de la secreción de insulina, una disminución del consumo de glucosa y un aumento de la producción de glucosa. Esta enfermedad es progresiva y se asocia con elevado riesgo de arteriosclerosis, daño renal y nervioso, al igual que ceguera, complicaciones de elevada morbi-mortalidad.

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más frecuente. Su prevalencia mundial se ha incrementado de forma espectacular en el transcurso de las dos últimas décadas. Entre 1976 y 1994, por ejemplo, la prevalencia de DM en los adultos de EEUU aumentó del 8,9% al 12,3%. Al aumentar su incidencia en todo el mundo es probable que siga siendo una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el futuro.

1.2.- CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS

Los avances recientes en los conocimientos respecto a la etiología y la patogenia de la diabetes han hecho que se revise su clasificación (tabla I.1). Aunque todas las formas de DM se caracterizan por la hiperglucemia, los mecanismos por los que ésta se produce son muy diversos.

TABLA I. 1.: CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES MELLITUS.

-
- I. Diabetes de tipo 1 (destrucción de las células β , que habitualmente provoca déficit absoluto de insulina)
 - A. Mediada inmunitariamente
 - B. Idiopática
 - II. Diabetes de tipo 2 (varía entre una resistencia a la insulina predominante con déficit relativo de insulina y un defecto secretor de insulina predominante con resistencia a la insulina)
 - III. Otros tipos específicos de diabetes
 - A. Defectos genéticos de la función de las células β caracterizado por mutaciones en:
 - 1. Factor de transcripción nuclear hepatocitario (HNF) 4 α (MODY 1)
 - 2. Glucocinasa (MODY 2)
 - 3. HNF-1 α (MODY 3)
 - 4. Factor promotor de insulina (IPF) 1 (MODY 4)
 - 5. HNF-1 β (MODY 5)
 - 6. ADN mitocondrial
 - 7. conversión de proinsulina o insulina
 - B. Defectos genéticos en la acción de la insulina
 - 1. Resistencia a la insulina de tipo A
 - 2. Leprechaunismo
 - 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
 - 4. Diabetes lipotrófica
 - C. Enfermedades del páncreas exocrino: pancreatitis, pancreatectomía neoplasia, fibrosis quística hemocromatosis, pancreatopatía, fibrocalculosa.
 - D. Endocrinopatías: acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma feocromocitoma, hipertiroidismo somatostatina, aldosteronoma
 - E. Inducida por fármacos o productos químicos: Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, diazóxido, agonistas β -adrenérgicos, tiazidas, fenitoína, interferón α , inhibidores de proteasa, clozapina, betabloqueantes.
 - F. Infecciones: rubéola congénita, citomegalovirus, coxsackie.
 - G. Formas infrecuentes de diabetes mediada inmunitariamente: síndrome del "hombre rígido" anticuerpos contra el receptor de la insulina
 - H. Otros síndromes genéticos que a veces se asocian a la diabetes:
síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, corea de Huntington, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, ataxia de Friedreich, distrofia miotónica porfiria, síndrome de Prader-Willi
 - IV. Diabetes gravídica (DG)
-

Algunas formas de DM se caracterizan por un déficit absoluto de insulina o un defecto genético que provoca una secreción defectuosa de insulina, mientras que otras formas tienen en común la resistencia a la insulina. Las transformaciones recientes de la clasificación son el reflejo de un intento de clasificar la DM basándose en el proceso patogénico que conduce a la hiperglucemia, en contraposición con criterios como la edad de aparición o el tipo de tratamiento.

Los dos grandes grupos de DM se designa como tipo 1 y tipo 2. La DM de tipo 1A es el resultado de la destrucción autoinmunitaria de las células β , que suele provocar déficit de insulina.

La DM de tipo 1B también se caracteriza por el déficit de insulina, así como por la tendencia a experimentar cetosis. Sin embargo, los individuos con DM de tipo 1B carecen de marcadores inmunológicos que indiquen un proceso destructor autoinmunitario de las células β .

La DM de tipo 2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se suelen caracterizar por grados variables de resistencia a la insulina, alteración de la secreción de insulina y un aumento de la producción de glucosa.

La clasificación actual de la diabetes mellitas difiere de las anteriores en dos aspectos. Primero, los términos diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) están obsoletos. Estas denominaciones del pasado reflejaban la observación que la mayoría de los individuos con DM de tipo 1 (antes DMID) tienen una necesidad absoluta de tratamiento con insulina, mientras que muchos sujetos con DM de tipo 2 (antes DMNID) no requieren tratamiento con insulina para evitar la

cetoacidosis. Sin embargo, dado que muchos pacientes con DM de tipo 2 terminan por necesitar insulina para el control de la glucemia, el empleo de este último término generaba mucha confusión.

1.3 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

Los criterios revisados son el reflejo de los nuevos datos epidemiológicos y metabólicos y se basan en el espectro de la glucosa plasmática en ayunas (GPA) y la respuesta a una sobrecarga oral de glucosa.

La DM se define como aquel nivel de glucemia en el que se observan complicaciones específicas de la diabetes, no basándose en el nivel de tolerancia a la glucosa desde el punto de vista de la población.

La tolerancia a la glucosa se clasifica en tres grupos en función de la GPA:

1. Una GPA $<6,1$ mmol/L (110 mg/dL) se considera normal.
2. una GPA $\geq 6,1$ mmol/L (110 mg/dL) pero <7 mmol/L (126 mg/dL) se define como glucemia basal anómala (GBA).
3. una GPA \geq de 7 mmol/L (126 mg/dL) justifica el diagnóstico de DM.

Desde el punto de vista diagnóstico, se considera que un paciente presenta diabetes si el valor de la glucosa plasmática en ayunas (al menos 8 h sin ingesta) es mayor de 126 mg/dl en dos determinaciones (con siete días de intervalo). En caso de que el resultado sea menor de dicha cantidad, se debe realizar una carga de 75 g de glucosa en 375 ml de agua, y se considera diabético a todo paciente que presente un valor igual o superior a 200 mg/dl 120 minutos después de la carga.

1.4- EPIDEMIOLOGÍA. IMPORTANCIA SOCIOLÓGICA.

Este síndrome es de elevada importancia social, ya que, debido a su gran prevalencia y a sus complicaciones a largo plazo, conlleva una importante morbi-mortalidad. En este punto podemos reseñar que la **retinopatía diabética** es la primera causa de ceguera en Occidente. La macroangiopatía diabética, por otro lado, da origen a la **enfermedad cardiovascular** de estos pacientes, siendo ésta la causa más frecuente de muerte de los diabéticos no insulino-dependientes. La **nefropatía diabética** es la causa más frecuente de fracaso renal crónico en Occidente y además, el principal motivo de muerte de los diabéticos insulino-dependientes. La **neuropatía** es, finalmente, causa de elevada morbilidad, pero no provoca mortalidad en estos enfermos. Asimismo, son altamente impactantes los siguientes datos: el paciente con diabetes aumenta 25 veces el riesgo de ceguera, 20 veces el riesgo de fallo renal, 20 veces el riesgo de amputación consecuencia de una gangrena, y de 2 a 6 veces el riesgo de isquemia miocárdica o accidente cerebrovascular (1).

1.5- PATOGENIA

1.5.1.- Diabetes de tipo I

Cuando se manifiesta la DM tipo 1A más del 90% de las células beta pancreáticas han sido destruidas. Este proceso destructivo es probablemente de naturaleza autoinmune, aunque todavía existen muchos interrogantes en este sentido.

La secuencia patogénica más admitida en la actualidad es la siguiente:

- 1.- Predisposición genética (Sistema HLA)
- 2.- Agresión ambiental: virus, alimentos.
- 3.- Insulitis: infiltración de linfocitos T.

4.-Activación de la autoinmunidad (anticuerpos antiislole pancreático o ICA).

5.- Ataque inmune a las células beta, sin afectación de las células alfa.

6.- Diabetes Mellitus.

En primer lugar, es necesaria la susceptibilidad genética a la enfermedad, probablemente la predisposición genética sea de tipo permisivo y no causal. En segundo lugar, se requiere el efecto de un factor ambiental para iniciar el proceso en los sujetos con susceptibilidad genética. Se piensa que las infecciones virales representan un mecanismo desencadenante común, pero también podrían estar implicados agentes no infecciosos. La prueba más clara de que los factores ambientales son esenciales deriva de los estudios efectuados en gemelos monocigóticos, en los que la tasa de concordancia para la diabetes es inferior al 50 %. Si la diabetes fuera una enfermedad puramente genética, la tasa de concordancia debería por el contrario aproximarse al 100 %. La probabilidad de desarrollar DM tipo 1 en los familiares de primer grado es tan sólo del 5 al 10%. La tercera etapa de esta secuencia es la respuesta inflamatoria del páncreas, denominada insulinitis. Las células que infiltran los islotes son monocitos / macrófagos y linfocitos T activados que desempeñan un papel importante en la destrucción de las células beta. La cuarta etapa consiste en una alteración o transformación de la superficie de la célula beta, que ya no se reconoce como propia, sino que aparece como una célula extraña o ajena para el sistema inmunitario. La quinta etapa consiste en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Debido a que los islotes son considerados ajenos, aparecen anticuerpos citotóxicos que actúan en combinación con los mecanismos de inmunidad celular. El resultado final es la destrucción de la célula beta y la aparición de diabetes.

1.5.2.- Diabetes Mellitus tipo II

El progreso efectuado en la patogenia de la diabetes mellitus de tipo 2 ha sido muy escaso.

El mecanismo de herencia no es conocido, pero la influencia genética es notoria. La concordancia para la DM tipo 2 en gemelos monocigotos es cercana al 100%. El riesgo de presentar intolerancia a la glucosa o diabetes en los descendientes y en los hermanos es mayor que en la DM tipo 1. No se ha observado ninguna relación con el sistema HLA ni la existencia de fenómenos autoinmunes. Es muy probable que existan varios genes implicados en el origen de la DM tipo 2, aunque todavía no se ha identificado el candidato preciso.

Existe otro tipo de DM, denominada **Diabetes tipo MODY** (Maturity Onset Diabetes Young), que se caracteriza por hiperglucemia leve en personas jóvenes, con resistencia a la cetosis y una importante historia familiar de diabetes. Este trastorno se hereda de forma Autosómica Dominante y se ha asociado con mutaciones en el gen de la glucoquinasa, localizado en el brazo corto del cromosoma 7.

Entre un 80 y un 90% de los pacientes con DM tipo 2 son obesos, de ello se puede deducir que una dieta rica en hidratos de carbono y grasa, así como una vida sedentaria, favorezcan la aparición de este trastorno.

En la DM tipo 2 existen dos defectos polares:

- 1.- El déficit de producción de insulina por el páncreas.
- 2.- La resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos.

No se conoce cuál de los dos defectos es primario, aunque la mayoría de los autores considera que la resistencia a la insulina es primaria y que la hipersecreción de insulina para compensar la resistencia a esta hormona acaba agotando la capacidad de la célula beta. La masa de células beta se conserva intacta, a diferencia de lo que ocurre en la DM tipo 1. Las células alfa aumentan, lo que explica el exceso relativo del glucagón respecto a la insulina en la DM tipo 2.

1.6.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA DIABETES MELLITUS.

La diabetes es una enfermedad de afectación multisistémica y generalmente los pacientes refieren síntomas relacionados con la hiperglucemia (sintomatología cardinal): poliuria, polidipsia, polifagia, astenia y adelgazamiento. En otras ocasiones puede debutar como una descompensación metabólica aguda: cetoacidosis, coma hiperosmolar, etc. En la tabla I.2. esquematizamos las diferencias entre la DM tipo 1 y la DM tipo 2.

1.6.1.- DM tipo 1

Suele comenzar antes de los 40 años, aunque algunos pacientes pueden presentar DM tipo 1 después de los 50. El inicio de los síntomas suele ser brusco, con clínica cardinal (poliuria, enuresis en los niños, polifagia, polidipsia) y pérdida de peso a lo largo de varios días o semanas. A veces la enfermedad debuta como una cetoacidosis. Los pacientes DM tipo 1 presentan un peso normal o reducido, los niveles de insulina son indetectables y los de glucagón están aumentados. El tratamiento con insulina es necesario desde el principio. Con frecuencia después del comienzo de la enfermedad existe un periodo de remisión parcial ("luna de miel") de duración variable, donde las necesidades de insulina se reducen.

1.6.2.- DM tipo 2

Suele comenzar en edades intermedias o avanzadas. La clínica suele presentarse de forma insidiosa a lo largo de semanas o meses, y es frecuente el hallazgo casual en pacientes asintomáticos. En pacientes mayores puede comenzar como un coma hiperosmolar. La mayoría de los pacientes suele presentar sobrepeso, los niveles de insulina son normales o elevados (aunque menores de lo esperado según el nivel glucémico - déficit relativo de insulina) y la concentración de glucagón también está elevada (no supresible con insulina). El tratamiento de los pacientes va dirigido a la reducción de peso, y en el caso de que con el tratamiento dietético sólo no se consiga controlar la hiperglucemia es necesario asociar antidiabéticos orales. En muchas ocasiones es necesario llegar finalmente al tratamiento con insulina para controlar las cifras de glucosa.

TABLA I. 2.: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DM tipo 1 Y DM tipo 2

	DM tipo 1	DM tipo 2
LOCUS GENÉTICO	Cromosoma 6	Desconocido
EDAD DE COMIENZO	Menores de 40 años	Mayores de 40 años
HÁBITO CONSTITUCIONAL	Normal o asténico	Obeso
INSULINA PLASMÁTICA	Reducida o ausente	Normal o elevada
GLUCAGÓN PLASMÁTICO	Elevado y supresible	Elevado y resistente
COMPLICACIONES AGUDAS	Cetoacidosis	Coma hiperosmolar
TRATAMIENTO INSULÍNICO	Responde	Puede responder o haber cierta resistencia
TRATAMIENTO CON ANTIDIABÉTICOS ORALES	Falta de respuesta	Respuesta correcta

1.7.- COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS.

1.7.1.- Complicaciones agudas de la diabetes.

Podemos resumir de forma escueta estas dos complicaciones como sigue (2):

A.- Cetoacidosis diabética.

Complicación de los DM tipo 1 que se puede definir bioquímicamente como una glucemia mayor de 300 mg/dl, con cuerpos cetónicos superiores a 3mmol/L, sumada a una acidosis metabólica con disminución del bicarbonato plasmático. En su fisiopatología se combinan por una parte un déficit de insulina y el aumento de las hormonas contrainsulares, estimulando la glucogenolisis hepática y la gluconeogénesis; y por otra la activación de la cetogénesis a partir de los ácidos grasos libres.

Los factores desencadenantes pueden ser desde el abandono de la insulina, hasta una transgresión dietética o una situación de estrés. La mortalidad es del 10% (2).

B.- Coma hiperosmolar.

Complicación de los DM tipo 2 que se puede definir bioquímicamente como una glucemia mayor de 600 mg/dl. con osmolaridad plasmática mayor de 350 mOsm/kg, sin cetosis asociada. Se caracteriza por una deshidratación profunda consecuencia de una diuresis osmótica por la hiperglucemia mantenida. La mortalidad puede alcanzar el 50% (2).

1.7.2.- Complicaciones crónicas de la diabetes.

Las complicaciones crónicas de la diabetes son fundamentalmente vasculares. Por su enorme frecuencia y repercusión clínica, vamos a centrar este somero resumen principalmente en ellas. Las complicaciones vasculares del diabético pueden afectar tanto a los vasos de mediano o gran calibre (MACROANGIOPATÍA), como a la microcirculación (MICROANGIOPATÍA). Las lesiones microvasculares se localizan típicamente a nivel renal, retiniano o nervioso (vasa nervorum). Las causas de estas complicaciones se desconocen y todo apunta a que sean de origen multifactorial. Por un lado existe la *teoría genética*, que defiende la existencia de una determinada predisposición para el desarrollo de complicaciones vasculares en la diabetes. Por otro lado tenemos la *teoría metabólica*, que apoya el hecho de que es la alteración del metabolismo, hidrocarbonado la que origina estas alteraciones vasculares. Dentro de esta teoría se han sugerido varias vías: vía de los polioles (sorbitolaldosarreductasa), y la glicación no enzimática de las proteínas. Actualmente se está postulando el papel de los radicales libres y el *estrés oxidativo* como desencadenantes de estas complicaciones. La implicación de los radicales libres en estos procesos se desarrollará más adelante en este capítulo de Introducción. Brevemente, podemos resumir las peculiaridades de estas complicaciones como sigue (2).

A.- Macroangiopatía diabética.

La arteriosclerosis se produce de manera más extensa y precoz que en la población general, además iguala la frecuencia de aparición entre varones y mujeres. Entre los factores que favorecen la aparición de la arteriosclerosis acelerada destacan los siguientes: mayor

incidencia de hipertensión arterial, aumento del colesterol LDL, glicación no enzimática de las lipoproteínas y aumento de la adherencia plaquetaria.

La arteriosclerosis produce síntomas variados dependiendo de la localización: claudicación intermitente, gangrena, impotencia de origen vascular en el varón, arteriopatía coronaria (angor, infarto agudo de miocardio (IAM) e ictus). Los *by-pass* y las técnicas de revascularización son mucho menos eficaces que en la población no diabética (2).

B.- Microangiopatía diabética.

a.- Retinopatía diabética.

La frecuencia de la retinopatía diabética varía con la duración de la enfermedad y la edad de comienzo, aproximadamente el 80 % de los diabéticos terminan presentando alguna lesión. Se desarrolla antes en pacientes de edad avanzada, pero no suele ser proliferativa. La retinopatía proliferativa parece ser más frecuente en los pacientes tratados con insulina, posiblemente porque el curso de su enfermedad es más largo al iniciarse en etapas más tempranas de la vida.

La aparición de la retinopatía diabética está condicionada inicialmente por la existencia de un aumento de la permeabilidad capilar de la retina (demostrable por escape del contraste en la angiofluoresceingrafía), y la posterior oclusión de los capilares retinianos y la formación de microaneurismas. Las lesiones de la retinopatía diabética se clasifican en dos grandes grupos: retinopatía no proliferativa y retinopatía proliferativa. La retinopatía proliferativa en general se considera el estadio más avanzado de la retinopatía

diabética. Las características más importantes de la retinopatía proliferativa son la formación de nuevos vasos y la cicatrización.

El edema macular es la causa más frecuente de pérdida de visión en la DM tipo 2. La hemorragia vítrea por tracción y el desprendimiento de retina son las complicaciones más temidas de la retinopatía proliferativa. En las fases iniciales de la retinopatía no proliferativa el tratamiento intensivo de las diabetes y la mejoría del control glucémico constituyen el mejor abordaje terapéutico posible.

La fotocoagulación local está indicada en la maculopatía diabética, mientras que la panfotocoagulación se aplicará en caso de retinopatía proliferativa (2).

b .- Nefropatía diabética.

Alrededor del 35% de los DM tipo 1 presentan nefropatía diabética. La prevalencia en los DM tipo 2 varía entre un 15 y un 60% en función del trasfondo genético. La nefropatía permanece silente durante un periodo largo (10-15 años) desde el diagnóstico. La microalbuminuria es el marcador precoz más utilizado como indicador de nefropatía, y parece predecir la mortalidad cardiovascular de los diabéticos. Cabe destacar que las complicaciones cardiovasculares y renales producen el 70% de mortalidad en los pacientes diabéticos. Cuando la eliminación de proteínas en orina es superior a 300 mg/24 horas se considera que existe proteinuria macroscópica (nefropatía establecida). Una vez iniciada la fase de proteinuria macroscópica se produce un descenso progresivo de la tasa de filtración glomerular, hasta llegar a la insuficiencia renal grave a los cinco años de aparición de la proteinuria. La aparición de hipertensión suele ir paralela a la proteinuria y acelera la evolución de la enfermedad renal. En fases finales puede existir síndrome nefrótico. No existe tratamiento

específico para la nefropatía diabética, pero se puede prevenir su aparición, o frenar su evolución, controlando de forma estricta la glucemia y la presión arterial, instaurando una dieta baja en proteínas y añadiendo fármacos inhibidores de la enzima conversora de la angiotensina (2).

c.- Neuropatía diabética.

La neuropatía diabética es una causa frecuente de morbilidad en los pacientes diabéticos, y puede afectar casi a cualquier parte del sistema nervioso central. La forma más frecuente de presentación es una polineuropatía periférica simétrica y distal, pero la más molesta y discapacitante es la neuropatía autonómica; con disfunción esofágica, alteración del vaciamiento gástrico, diarrea-estreñimiento, vejiga neurógena, impotencia, dishidrosis, hipoglucemias inadvertidas, hipotensión ortostática..., incluso síncope y muertes súbitas (2).

1.8.- TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS.

Podemos esquematizar el tratamiento de esta enfermedad en los siguientes pasos:

- 1.- DIETA: Es el factor fundamental para el control metabólico de estos pacientes.
- 2.- EJERCICIO FÍSICO. Importante para mantener un control glucémico adecuado.
- 3.- ANTIDIABÉTICOS ORALES. Fármacos utilizados en el tratamiento de aquellos pacientes DM tipo 2 que no pueden controlarse exclusivamente con dieta.

4.- INSULINA. Actualmente ya es insulina humana, de varios tipos y pauta de forma individual en los pacientes diabéticos insulino-dependientes.

2.- RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO.

2.1.- INTRODUCCIÓN. METABOLISMO AEROBIO.

Inicialmente la atmósfera de la tierra era deficitaria en oxígeno, y los primeros seres que aparecieron eran anaerobios. Estos seres utilizaban la luz como fuente de energía para su existencia. La fotólisis del agua produjo un enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera y la aparición de los seres aerobios.

El origen de la vida aerobia supuso un gran paso en la evolución, ya que hizo posible la restitución del CO₂ y del agua consumidos por los organismos fotosintéticos, de tal forma que se creó el ciclo redox de la biosfera.

Los seres vivos aerobios obtienen la energía necesaria para la vida a partir de la oxidación de nutrientes orgánicos. Como aceptor final de electrones utilizan al O₂ con la consiguiente formación de agua. En los eucariotas, esta última etapa tiene lugar en las mitocondrias, concretamente en la membrana interna mitocondrial, donde existe una serie de proteínas de oxirreducción (cadena de transporte electrónico) que se encargan de transportar electrones desde coenzimas reducidos hasta el O₂ y la energía liberada en este proceso se utiliza para la síntesis de ATP.

Como podemos deducir, el comienzo de la vida aerobia supuso un gran avance a nivel energético y un requisito para la aparición de todas las especies animales, incluyendo el hombre. A pesar de ello, en la actualidad se conocen una gran cantidad de procesos nocivos en los que está implicado el oxígeno. Dichos procesos son denominados efectos tóxicos del oxígeno (3), y están mediados por radicales libres derivados del oxígeno (4).

2.1.1 - Concepto de radical libre

Un radical libre es aquella especie química, que tiene uno o más electrones desapareados en su última capa. Esta característica les proporciona una gran reactividad.

2.1.2.- Mecanismos generadores de radicales libres

Los radicales libres se generan continuamente en las células expuestas a un ambiente aerobio. Los sistemas enzimáticos antioxidantes han evolucionado paralelamente al metabolismo aerobio para contrarrestar el daño oxidativo debido a estos radicales. A pesar de esta defensa antioxidante, el daño oxidativo sobre las proteínas, lípidos, glúcidos y al DNA (5-7), acumulado a lo largo de la vida, está en el origen de enfermedades degenerativas como el Alzheimer (8). Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes (9-11), patologías cardiovasculares (12), procesos reumáticos (13), patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares (14, 15) así como en procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer (8). También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento (16, 17), el daño

causado por el ejercicio físico agotador (18-20), la transición fetalneonatal (21) y otros.

Los radicales libres se forman en las células en numerosos procesos tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidasa) y en el metabolismo de xenobióticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente.

Los radicales libres aparte de las fuentes endógenas descritas anteriormente pueden también proceder de fuentes externas. Con la dieta se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo de tabaco da lugar a radicales libres, la contaminación ambiental, el ozono, etc (22-24).

2.2.- TIPOS DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres pueden ser derivados de oxígeno: ERO (Especies Reactivas del Oxígeno) o de nitrógeno: ERN (Especies Reactivas del Nitrógeno).

2.2.1- Radical libres de oxígeno (ERO)

Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica O_2 , presentando los electrones que forman parte del enlace π antienlace el mismo espín (estado triplete). En esta forma el oxígeno es solo moderadamente reactivo. Sin embargo, por efecto de radiaciones ionizantes, o por la acción de enzimas, o por mecanismos puramente químicos, se pueden generar una serie de especies químicas (radicales libres) capaces de reaccionar

con otros compuestos presentes en el organismo y consecuentemente producir daño celular (25).

Las ERO pueden tener un origen endógeno o exógeno (26, 27). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno *in vivo* se generan con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O_2 y H_2O_2 (28).

Las ERO son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno.

Las principales clases de ERO son las siguientes:

TABLA I. 3: PRINCIPALES CLASES DE ERO

ESPECIE	SIMBOLO
Radical superóxido	$O_2^{\bullet -}$
Radical hidropéroxido	HO_2^{\bullet}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\bullet}
Oxígeno singlete	1O_2
Radical alcóxilo	RO^{\bullet}
Radical peróxilo	ROO^{\bullet}
Ozono	O_3

2.2.1.1- Radical superóxido $O_2^{\bullet -}$

El radical es la forma dominante a pH fisiológico (29). En el metabolismo aerobio entre 1%-2% del consumo total de oxígeno da

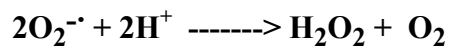
lugar a la formación del anión superóxido. Es relativamente poco reactivo e inestable, pero potencialmente tóxico. Es inestable y puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Tiene una vida media de algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, que consiste en la reacción entre dos radicales superóxido para dar agua oxigenada y oxígeno (30).

Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (25), de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), de reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (31, 32), la riboflavina, o bien producirse en la cadena respiratoria mitocondrial (33).



2.2.1.2- Peróxido de hidrógeno H₂O₂

No es un radical libre, pero su toxicidad es importante. Atraviesa con facilidad las membranas celulares. Se forma a base de las reacciones del ión superóxido o bien por la reducción directa del oxígeno por dos electrones:



Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Muchas enzimas producen agua

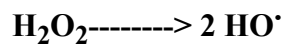
oxigenada a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc. (34, 35), y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (25). Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media. Parece que el H_2O_2 está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del NF- κ B y AP-1.

Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como de la interleukina 2 (IL-2), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos. (36-38).

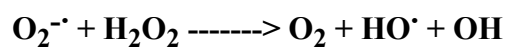
2.2.1.3. Radical hidroxilo HO^\bullet

Es la especie química más reactivas que se conoce y, por tanto, más tóxica. Tiene una vida media estimada de alrededor de 10^{-9} s (39).

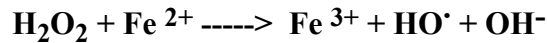
Puede formarse *in vivo* como consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo.



El radical hidroxilo también se puede formar como consecuencia de la reacción de Haber-Weiss (40):



Uno de los procesos más importantes de producción de radical hidroxilo es la reducción del agua oxigenada por ciertos iones metálicos. La reacción de Fenton (41) utiliza Fe^{2+} y el peróxido de hidrógeno:



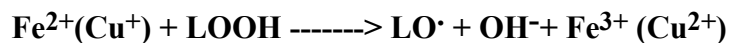
2.2.1.4. Oxígeno singlete

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es una forma activa del oxígeno, que se diferencia de la forma normal, triplete, en que los electrones del orbital antienlace tienen espines opuestos. Esta forma es mucho más reactiva que el oxígeno triplete. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas.

Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, por la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (42).

2.2.1.5. Radical Alcoxilo ($\text{RO}\cdot$)

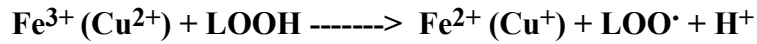
El radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) se puede formar durante la degradación de los lipoperóxidos en reacciones catalizadas por metales pesados:



2.2.1.6. Radical peroxilo (ROO[•])

El radical peroxilo RO₂[•] es un producto intermedio de la lipoperoxidación.

También se puede formar en reacciones del tipo:



Tiene una vida media relativamente larga (del orden de segundos).

2.2.1.7. Ozono

El ozono (O³) es un compuesto típico de las capas altas de la atmósfera y que puede reaccionar con distintos compuestos biológicos.

2.2.2- Radicales libres de nitrógeno (ERN)

Las especies reactivas del nitrógeno representan otra clase de radicales libres a los cuales, en los últimos años, se les ha dado mucha importancia. Se pueden clasificar en:

TABLA I. 4: PRINCIPALES ERN

ESPECIE	SIMBOLO
Oxido nítrico	NO [•]
Peroxido de nitrógeno	ONOO ^{•-}
Dióxido de nitrógeno	NO ₂ [•]

2.2.2.1. Óxido nítrico (NO[•])

El óxido nítrico tiene una gran importancia por su función fisiológica, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, con una vida media relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO[•] en numerosos tipos celulares (43, 44).

Dicha enzima presenta cuatro isoformas: la neuronal nNOS (tipo I), la endotelial eNOS (tipo III) y la inducible iNOS (tipo II) (45, 46).

El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos: actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa (47).

Otro efecto del NO[•] reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

El NO[•] posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto pro-inflamatorio. Para entender este doble efecto diversos autores proponen que los efectos reguladores y anti-inflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste ejerce una acción

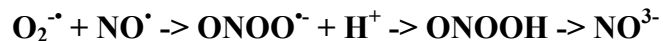
directa sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de NO• es baja (30). Sin embargo, cuando las concentraciones de NO• aumentan, el NO• tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

Un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad se cree que es debida al •O₂⁻, con el que reacciona para dar lugar a anión peroxinitrito (ONOO⁻)

2.2.2.2. Peroxinitrito (ONOO⁻)

No es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (48). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos y de fragmentar ADN (49, 50).

El anión peroxinitrito (ONOO⁻) se forma por la reacción entre el óxido nítrico con el anión superóxido (51), tal como se muestra en la siguiente reacción:



El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH).

En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles. Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina (52). 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. La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de $\text{O}_2^{\bullet-}$, debido a la competencia entre éste y el NO^\bullet por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ superara la de NO^\bullet (52). Asimismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ sin la consiguiente formación de H_2O_2 , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio (53).

2.2.2.3. Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO^\bullet atmosférico (54). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (55).

2.3.- FUENTES DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres provienen a través de fuentes exógenas y endógenas:

2.3.1.- Fuentes exógenas.

2.3.1.1.- Agentes antineoplásicos y antibióticos.

Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de

hidrógeno y radical hidroxilo. Entre ellos se encuentran: la adriamicina, bleomicina, daunorubicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad (56).

2.3.1.2.- Factores ambientales

Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (57).

2.3.2.- Fuentes endógenas

2.3.2.1.- La cadena de transporte electrónico mitocondrial

En los tejidos sanos una de las principales fuentes de radicales libres son las mitocondrias. Orgánulos responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular.

La cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura I.1.) es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo una de las causas del estrés oxidativo que sufre la célula.

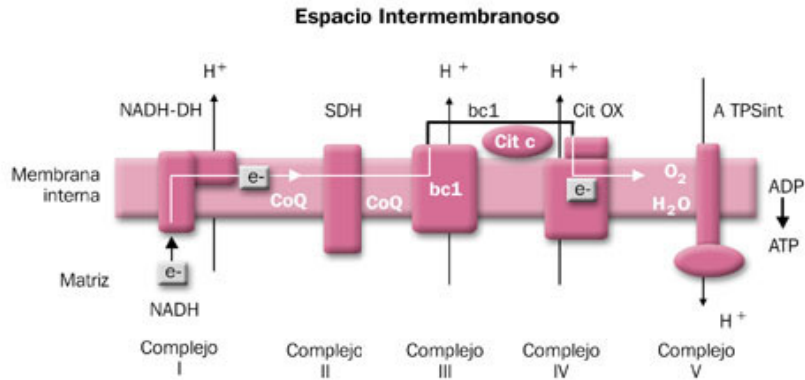


Figura I.1. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial

2.3.2.2.- Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales.

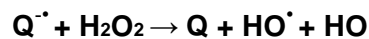
Se calcula que entre el 1% y el 2% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno (58). Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante.

El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O (59). Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente

al O₂, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado (59). Así pues, se produce $\text{O}_2^{\cdot -}$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres (60). La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966. Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (61).

Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\text{O}_2^{\cdot -}$ por célula y por día (24). Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

Experiencias *in vitro* demuestran que formas solubles de la semiquinona son capaces de producir $\text{O}_2^{\cdot -}$ por autooxidación en medios oxigenados, por lo que se propuso que la ubisemiquinona mitocondrial era una de las fuentes de ion superóxido (58). Sin embargo, consideraciones termodinámicas descartan un papel directo de la dismutación de la ubisemiquinona en la producción de este radical *in vivo*, porque el ciclo redox de la ubiquinona tiene lugar enteramente en la fase apolar de la membrana, y en tales condiciones la autooxidación de las quinonas se ve desfavorecida (59). La ubisemiquinona, en cambio, podría estar implicada en la formación de HO^{\cdot} a partir de H_2O_2 . Puesto que el peróxido de hidrógeno puede atravesar fácilmente las membranas biológicas puede entrar en contacto con la ubisemiquinona y producirse la reacción siguiente (59):



2.3.2.3.- Autooxidación de pequeñas moléculas

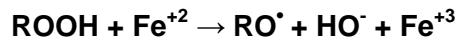
Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas. Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la disminución de radical superóxido, bien espontáneamente, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa

2.3.2.4.- Reacción de Fenton-Haber-Weiss

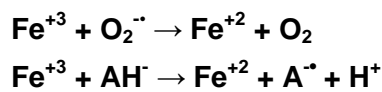
Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton) (41). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo (40). Esto puede representarse como sigue:



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (62). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (63, 64) y por el radical superóxido (27), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



Los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general están muy finamente regulados en los mamíferos. Hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox (28, 65).

2.3.2.4.- Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático y membrana nuclear.

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P_{450} y b_5 que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (66) y xenobióticos (67). De hecho, los citocromos P_{450} (término usado para un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidas entre los seres vivos) son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes

reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula.

2.3.2.5.- Peroxisomas

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del mismo. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- α -hidroxiácido oxidasa y acilgraso- coenzima A oxidasa (68). La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas (26).

2.3.2.6.- Membrana plasmática

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales (26).

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADPH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio, en las cuales desempeñan un papel importante como señales intracelulares.

Cabe destacar la importancia de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (69).

2.3.2.7.- Enzimas solubles y proteínas

Enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (70, 71).

2.3.2.8.- Fagocitos activados

Los fagocitos activados (neutrofilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar $O_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 como uno de los mecanismos para matar microorganismos (72)

2.3.2.8.- Xantina oxidasa

La xantina oxidasa es un enzima muy versátil que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (desde las bacterias hasta el hombre). Cataliza la oxidación de muchos sustratos, bien sean endógenos como las purinas o exógenos como el etanol. La principal función a nivel fisiológico es la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico.

El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las bases púricas en algunos primates y en el hombre.

La xantina oxidasa *in vivo* se encuentra fundamentalmente bajo la forma NAD⁺ dependiente deshidrogenasa. Esta forma es un homodímero y cada una de sus subunidades tiene un peso molecular aproximado de 150 KDa (73). La forma deshidrogenasa se puede convertir en oxidasa mediante la oxidación de grupos sulfhidrilos, siendo este paso reversible (74), o mediante un proceso proteolítico. Este último proceso es irreversible y está catalizado por una proteasa calcio dependiente que libera un fragmento peptídico de 20 KDa de cada subunidad (75). Tanto la forma oxidasa como la deshidrogenasa humanas están clonadas (73). La hipoxia es otro factor que puede transformar la forma deshidrogenasa en forma oxidasa (76). La forma deshidrogenasa utiliza como aceptor de electrones el NAD⁺ durante la oxidación de la hipoxantina. La forma oxidasa utiliza el O₂ como aceptor de electrones formando el radical superóxido(76). Además, algunos mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral también producen una conversión de la forma deshidrogenasa en la forma oxidasa (77).

La xantina oxidasa está implicada en el daño oxidativo producido durante los procesos de isquemia-reperfusión (78). Durante el periodo isquémico se produce, por una parte, una acumulación de

hipoxantina debido a una degradación masiva del ATP y, por otra, se produce una conversión intracelular de la forma deshidrogenasa a la forma oxidasa. Al inicio de la reperfusión, cuando aumenta la disponibilidad de O₂, la xantina oxidasa cataliza la oxidación de la hipoxantina acumulada en la fase hipóxica con la consiguiente formación de radical superóxido, y el consecuente daño oxidativo a las estructuras celulares.

Los tejidos, en la rata, que más actividad xantina oxidasa tienen son el intestino, el hígado, el riñón y el pulmón (76). También se ha detectado dicha actividad a nivel del endotelio (79) y aquí se ha relacionado con el daño endotelial que se produce en determinadas patologías como en la hipercolesterolemia, donde esta actividad se encuentra aumentada (80). Otro aspecto interesante es la localización a nivel celular. Por estudios histoquímicos se la ha situado en el citoplasma (81, 82). Sin embargo, estudios recientes también la han localizado en la parte externa de la membrana plasmática (83). Es más, en este último caso, se encuentra asociada a unos glicosaminglicanos presentes en la membrana (84, 85). Esta unión a los glicosaminglicanos es inhibida de una forma competitiva por la heparina (80, 84, 85).

Otro dato interesante es que el plasma de seres humanos tiene cantidades importantes de anticuerpos frente a la xantina oxidasa (86-88) y la función de estos anticuerpos es evitar la producción exagerada de especies oxidantes (88).

2.3.2.8.- Hiperglucemia

La glucosa puede reaccionar con los grupos aminos de las cadenas laterales de las proteínas para formar inicialmente una base de Schiff, la cual se reorganiza para formar productos más estables como

son los cuerpos de Amadori (89). Estos compuestos pueden reducir al oxígeno para formar inicialmente radical superóxido (90).

Otro mecanismo de formación de radicales libres relacionado con la hiperglucemia es la autooxidación de la glucosa (91). La glucosa, como todos los α -hidroxialdehídos, se encuentra en equilibrio con la forma enediol. El enediol, en presencia de metales pesados como el Cu^{2+} , puede dar lugar a la formación del radical enediolil, el cual, en presencia de oxígeno, forma el radical superóxido y un cetoaldehído. El radical superóxido, como ya hemos indicado anteriormente, puede formar peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. El cetoaldehído también puede ser tóxico ya que puede reaccionar con los grupos aminos de las cadenas laterales de las proteínas, y en un proceso autoxidativo generar radical superóxido.

2.3.2.9.- Oxido nítrico sintasa

Es un enzima que cataliza la formación de óxido nítrico a partir de la arginina. El óxido nítrico es un radical libre que tiene importantes funciones fisiológicas en el organismo (92). El óxido nítrico puede reaccionar con el radical superóxido dando lugar a la formación del anión peroxinitrito (ONOO^-), que es muy citotóxico (93).

2.3.2.10.- Otras enzimas

Enzimas citosólicas solubles como la aldehido oxidasa y enzimas unidos a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generan radicales libres durante su ciclo de catálisis (26, 27).

2.4.- DAÑO A BIOMOLÉCULAS COMO CONSECUENCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo.

Los organismos posean unos mecanismos de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes, sustancias que son capaces de retrasar o inhibir la oxidación de sustratos oxidables. El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, determinando una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción. Finalmente, el desequilibrio de este estado redox tiene unas consecuencias bioquímicas de forma que altera ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la “homeostasis redox”.

2.4.1 Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (94, 95). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren

(95). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (94).

Otro mecanismo muy importante de oxidación de proteínas son los llamados “Sistemas de oxidación de función mixta” o “Sistemas de oxidación catalizada por metal”, que poseen como dianas más comunes los residuos de arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína (94). Estos sistemas catalizan una serie de reacciones acopladas, enzimáticas o no, que implican la reducción del O_2 a H_2O_2 y del Fe^{+3} a Fe^{+2} (96, 97). La producción de H_2O_2 y de Fe^{2+} es la única función que tienen en común los sistemas de oxidación catalizada de metal.

Los sistemas más relevantes son diversas NADH y NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P_{450} reductasas (94).

En la tabla I.5. se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

TABLA I.5. SISTEMAS MÁS IMPORTANTES QUE GENERAN LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

SISTEMAS ENZIMATICOS
NADPH oxidasas/NADPH/Fe(III)/ O_2
<i>Xantina Oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/O_2</i>
Citocromo P_{450} reductasa/Citocromo P_{450} /NADPH/Fe(III)/ O_2
Citocromo P_{450} reductasa/redoxina/Citocromo P_{450} /NADH/Fe(III)/ O_2
Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/ O_2
SISTEMAS NO ENZIMATICOS
Ascorato/Fe(III)/ O_2
RSH/Fe(III)/ O_2
Fe(II)/ O_2
Fe(II)/ H_2O_2 (reactivo de Fenton)

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (94). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (94). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (98).

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (94), lo que se ve confirmado por las siguientes observaciones:

- La mayoría de los tejidos animales poseen una proteasa alcalina neutra que degrada las formas oxidadas de los enzimas, pero que apenas tiene actividad sobre las formas no oxidadas (99).
- La degradación *in vivo* de proteínas endógenas en mitocondrias de hígado y corazón y en eritrocitos se ve estimulada por la adición de sistemas generadores de radicales libres (100).

En el caso de las hemoproteínas, como la oxihemoglobina, el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con el hierro para formar metahemoglobina y otros productos de oxidación. Otra importante hemoproteína, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido.

2.4.2.- Daño oxidativo a los lípidos

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación (8). El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el peróxido ($\text{ROO}\cdot$), el alcóxilo ($\text{RO}\cdot$) y el alquílico ($\text{R}\cdot$). El proceso de ataque oxidativo a los lípidos (Figura I.2.), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (27, 101).

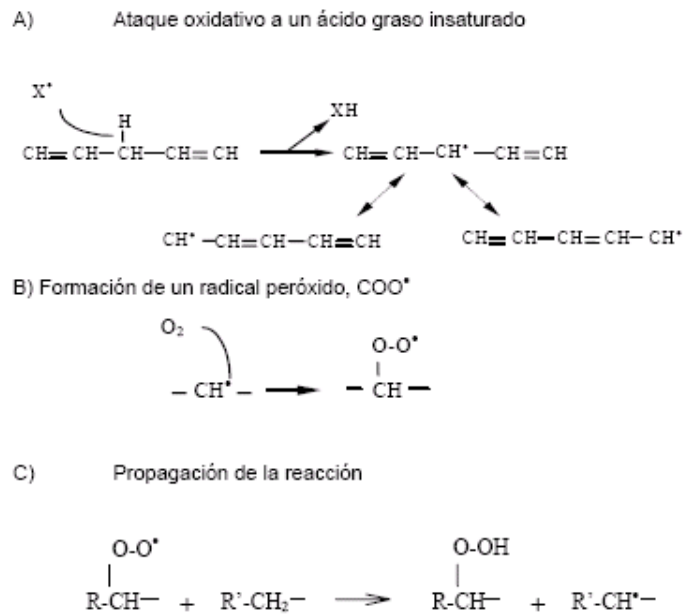


Figura I.2. Mecanismo de peroxidación lipídica

Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble (Figura I.2.A).

Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $R-COO^*$ (Figura I.2.B).

Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes (Figura I.2.C), se forma un radical alquílico ($R-CH\bullet$) y un peróxido lipídico ($R-COOH$), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (101). De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNN), e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (26, 28, 101, 102). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (27).

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (103). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (104, 105).

2.4.2.1.- Los oxisteroles

El colesterol por su estructura química, es un derivado del ciclopentano perhidrofenantreno, posee un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo aromático, que es también susceptible de sufrir oxidación. De esta manera, cuando el colesterol, presente en

muestras biológicas o en materias primas, u otros productos oleosos que lo contienen, es sometido a una oxidación, da origen a una serie de productos oxidados, de diferente estructura, aún no del todo definidos químicamente, que se identifican colectivamente con el nombre de oxisteroles (106). Los oxisteroles se forman toda vez que el colesterol como tal, o un producto orgánico que lo contiene (grasa o aceite), es sometido al efecto directo o indirecto de la temperatura, irradiaciones, metales (bivalentes, principalmente) o a agentes oxidantes orgánicos, como es el caso de algunas enzimas. El mecanismo de la oxidación no está del todo establecido (106), aunque se ha propuesto que los radicales libres formados en los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada del ácido graso (o en los peroxiradicales derivados de la oxidación) y que inician la proceso oxidativo, también serían iniciadores de la oxidación del colesterol (107). Se ha observado que las formas activas del oxígeno (radical hidroxilo, oxígeno singlete) que son iniciadoras de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturado (108), así como también los productos oxidados que se forman en los ácidos grasos poliinsaturados (peróxidos, hidroperóxidos, epóxidos, entre otros), pueden también iniciar y/o propagar la oxidación del colesterol (109). La evidencia experimental indica que la oxidación del colesterol se induciría en la fase primaria de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (iniciación). Se estima que es posible la formación de 34 productos distintos de oxidación del colesterol (110), sin embargo no todos se han identificado, siendo los oxisteroles menos polares los mejor caracterizados. Los productos más comunes de oxidación no enzimática del colesterol, claramente identificados y que se ofrecen comercialmente como estándares o para fines experimentales, se muestran en la figura I.3.

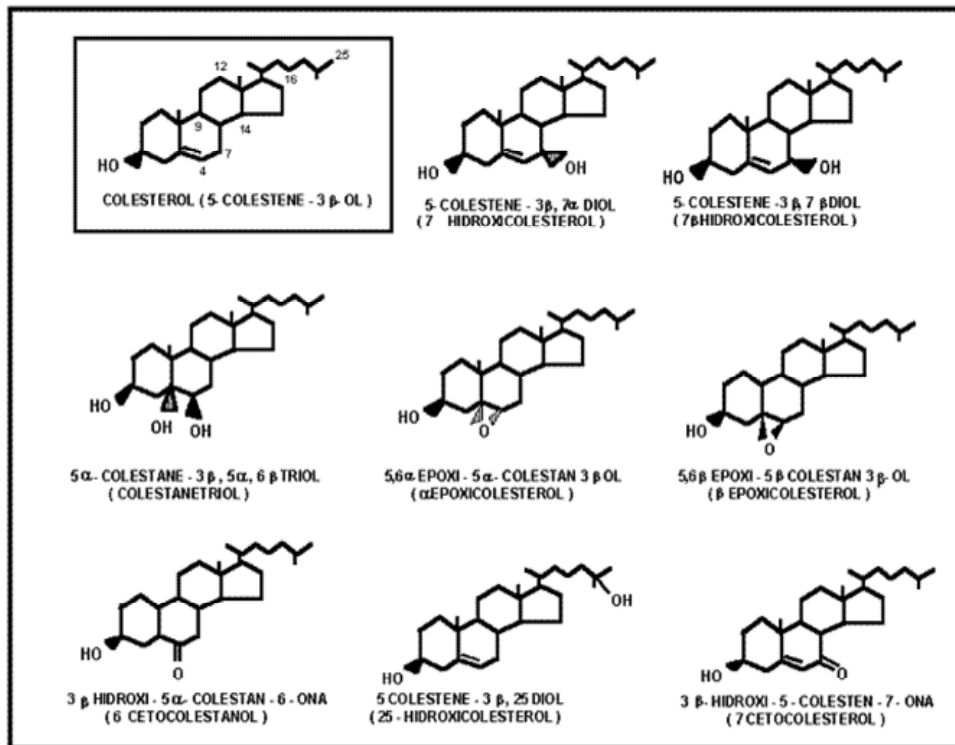


Figura I.3. Óxidos del colesterol: Oxisteroles

2.4.3.- Daño oxidativo a los glúcidos

Los radicales libres atacan a los glúcidos de forma distinta. Los monos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares.

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (111) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (112, 113). Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial (114).

Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar (112).

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo en la diabetes mellitus, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo (115, 116).

2.4.4.- Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el DNA dan lugar a un gran número de productos.

El número de bases modificadas diferentes encontradas en el ADN tras un ataque oxidativo, supera la veintena. La alteración de este tipo que se observa con más frecuencia es la 8-hidroxi-2' deoxiguanosina (8oxodG). Su importancia reside en su poder mutagénico ya que durante la replicación producirá transversiones T por C (117, 118). El daño oxidativo asociado a proteínas y al DNA no deben ser considerados de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadores puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el DNA, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (119, 120). Por ello las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (24). Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (24).

2.5.- SISTEMAS DE DEFENSA FRENTE A LOS RADICALES LIBRES.

2.5.1.- Generalidades.

Los seres vivos han desarrollado sistemas de defensa frente a la agresión por radicales libres. De hecho, el daño oxidativo solamente se produce cuando los mecanismos oxidantes superan la capacidad de los sistemas de defensa (121).

Los sistemas de defensa frente a los radicales libres los podemos clasificar según su mecanismo de acción, o según su naturaleza.

A.- SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN: A su vez los podemos clasificar en primarios o secundarios.

a.- Los primarios o preventivos evitan la formación del radical libre, es decir, actúan en la fase de iniciación. En este grupo debemos destacar aquellos que se encargan de detoxificar el hidroperóxido mediante la reducción del mismo a un alcohol, como la glutatión peroxidasa o la catalasa. El hidroperóxido, en presencia de fotoactivadores o de metales pesados, da lugar a la iniciación de la cadena radicalaria. Por tanto, aquellos mecanismos que se encarguen de la detoxificación del hidroperóxido evitarán la iniciación de la cadena. En este grupo también se encuentran los secuestradores de metales pesados como la ceruloplasmina o la transferrina. Como hemos comentado, los metales pesados catalizan la iniciación de la cadena radicalaria a partir de un hidroperóxido. El secuestro del metal pesado le hace perder esa capacidad de catálisis y, por tanto, actuará como un mecanismo preventivo.

b.- Los mecanismos secundarios evitan la propagación de la cadena radicalaria. La mayoría de estos compuestos son diarilaminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena radicalaria.

B.- SEGÚN LA NATURALEZA de los mecanismos de defensa frente a los radicales libres los podemos dividir en:

a.- Enzimáticos: La defensa enzimática a nivel intracelular frente a los radicales libres derivados del oxígeno está formada por la superóxido dismutasa y las peroxidasas (glutación peroxidasa y catalasa). La superóxido dismutasa y la glutación peroxidasa están localizadas tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial (122). La catalasa se localiza predominantemente en los peroxisomas, donde el peróxido de hidrógeno se genera a una velocidad relativamente alta (123).

Otras sustancias de naturaleza enzimática que tienen actividad antioxidante son la glutación reductasa, glutación S-transferasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

b.- No enzimáticos: Que a su vez se pueden clasificar en:

b1- Liposolubles: Dentro de este grupo se encuentran la vitamina E, los carotenoides, las quinonas, la bilirrubina y otros.

b2- Hidrosolubles: Dentro de este grupo se encuentran aquellos antioxidantes solubles en agua como la vitamina C, el ácido úrico, las proteínas secuestradoras de metales pesados como la ceruloplasmina o la transferrina, el glutación y otros tioles no proteicos, etc.

2.5.2.- Los antioxidantes fisiológicos más destacables.

2.5.2.1.- Glutación

El sistema formado por el glutatión y las enzimas que intervienen en el ciclo redox del glutatión forman el principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidantes (124).

La forma reducida del glutatión (GSH) es un tripéptido, γ -glutamilcisteinilglicina, y se trata del tiol no proteico más abundante a nivel intracelular (125).

Su estructura química:

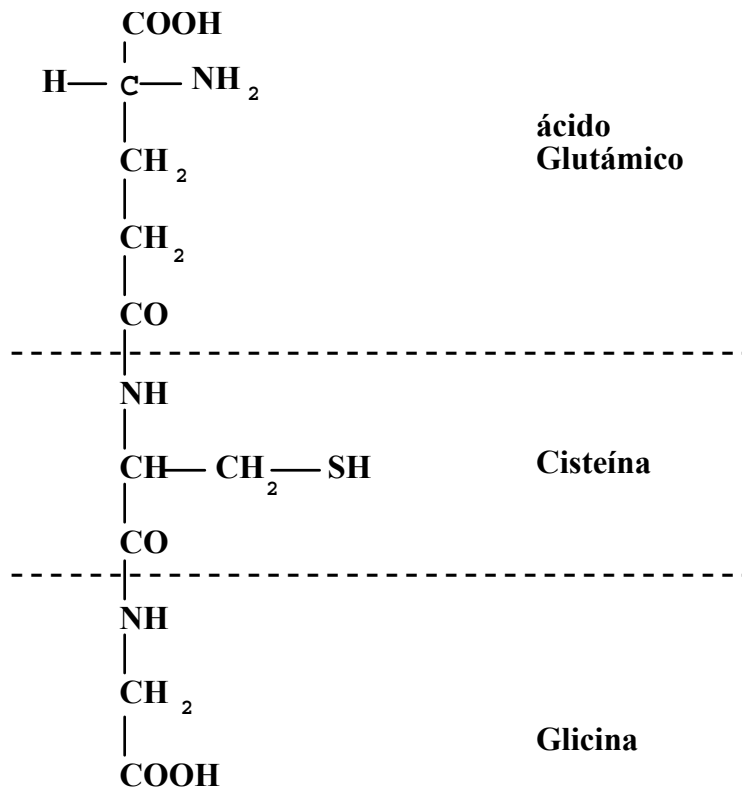


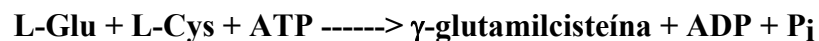
Figura I.4. Estructura química del Glutatión

Muchas de sus propiedades biológicas se deben a dos características estructurales:

1.- La presencia de un enlace γ -glutamilo, lo cual le confiere resistencia frente a las peptidasas presentes en las células con la excepción de la γ -glutamyltranspeptidasa (este enzima cataliza el primer paso en la degradación del glutatión).

2.- La presencia del grupo tiol de la cisteína, el cual se puede oxidar con otra molécula de GSH, dando lugar al glutatión disulfuro u oxidado (GSSG), o con otros grupos tiólicos como los residuos de cisteína de las proteínas.

Por lo que se refiere al metabolismo del glutatión, debemos destacar que en su síntesis intervienen dos enzimas. La primera de ellas es la γ -glutamylcysteinil sintetasa que cataliza la siguiente reacción:



Debemos tener en cuenta que el GSH inhibe la γ -glutamylcysteinil sintetasa (126). Es un mecanismo que evita sobreconcentración de glutatión en los tejidos.

El segundo paso en la síntesis de glutatión está catalizado por la glutatión sintetasa:



En condiciones fisiológicas, el paso limitante para la síntesis de glutatión es la disponibilidad de cisteína (127, 128). En

vertebrados, la vía más importante de obtención de cisteína es la de la transulfuración, vía que sintetiza cisteína a partir de metionina. El paso más importante de esta vía es el paso catalizado por la cistationasa, la cual hidroliza la cistationina para dar cisteína (129).

La degradación del GSH se produce vía γ -glutamyl transpeptidasa. Este enzima puede catalizar dos tipos de reacciones (130). Por una parte reacciones de transpeptidación, por las que se transfiere el γ -glutamilo del GSH o del GSSG a aminoácidos. Por otra parte, reacciones de hidrólisis del GSH, dando lugar a glutamato y a Cys-Gly, el cual se puede hidrolizar por dipeptidasas.

Otras reacciones importantes donde participa el glutatión son las reacciones de conjugación, catalizadas por la glutatión-S-transferasa. Esta es una reacción muy importante en la detoxificación de xenobióticos.

El glutatión presenta muchas funciones fisiológicas entre las que destacan (131):

- 1.- Interviene en la síntesis de DNA (132).
- 2.- Participa en la detoxificación de xenobióticos (133).
- 3.- Actúa como protector frente a las radiaciones y al estrés oxidativo (121).
- 4.- Participa en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular (134).
- 5.- Interviene en la captación de aminoácidos en algunos tejidos (135).

- 6.- Actúa como reservorio de cisteína (127).
- 7.- Interviene en la regulación de la síntesis (136) y de la degradación (137) de proteínas.
- 8.- Participa en la modulación de actividades enzimáticas (138).
- 9.- Interviene en la homeostasis del calcio (139).
- 10.- Participa en la regulación de la proliferación celular (140).

Por lo que se refiere al trabajo presentado en esta tesis doctoral, nos interesa mucho más la función protectora frente al estrés oxidativo. En este contexto es de importancia extrema el ciclo redox del glutatión:

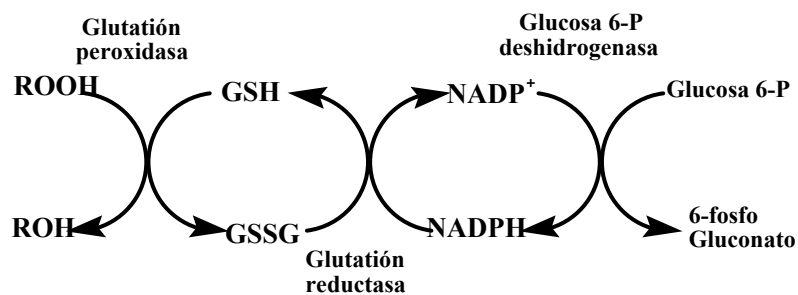


Figura I.5. El ciclo redox del glutatión

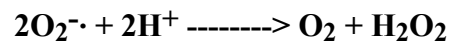
La actividad glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroperóxidos con la concomitante oxidación del glutatión. El GSH consumido es regenerado por la glutatión reductasa, y los equivalentes reductores los obtiene del NADPH. En el eritrocito, las enzimas que producen NADPH son la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-

fosfogluconato deshidrogenasa. En otros tejidos, además de éstas, existen otras deshidrogenasas que suministran NADPH.

El GSH también puede neutralizar directamente (en procesos no catalizados por la glutatión peroxidasa) los radicales libres derivados del oxígeno.

2.5.2.2.- Superóxido dismutasas.

La actividad superóxido dismutasa fue descrita por primera vez en 1969 (141). Forman un conjunto de enzimas que están presentes en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, pero que faltan en las células anaerobias. Esto es así porque la función fisiológica de las superóxido dismutasas es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio (142):



Hay descritas 4 formas diferentes de superóxido dismutasas (143). La primera se encuentra en el citosol y en el espacio intermembranoso mitocondrial, contiene cobre y zinc (Cu-Zn SOD), y no está relacionada con las otras tres, salvo en su actividad eliminadora de radicales superóxido. Un ejemplo de Cu-Zn SOD es la eritrocupreína, encontrada en los eritrocitos humanos y bovinos. Otras dos superóxido dismutasas contienen manganeso (Mn SOD), una de las cuales se encuentra en la matriz mitocondrial (144) y la otra aislada únicamente en bacterias tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*. El cuarto tipo contiene hierro y se ha encontrado en *Escherichia coli* (145).

La actividad superóxido dismutasa cumple un papel fundamental en la defensa antioxidante ya que es la primera línea de defensa. Debemos tener en cuenta que aproximadamente el 2 % del oxígeno que consumimos sigue la vía monovalente de reducción (146), lo cual supone una producción aproximada de unos 2 Kg de superóxido por año en el ser humano en condiciones basales (101). Esta cifra nos da una idea de la imposibilidad de vida aerobia sin la actividad superóxido dismutasa.

El radical superóxido es inestable en un medio acuoso y espontáneamente se dismuta. Sin embargo, la velocidad de dismutación no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, la velocidad de dismutación espontánea está alrededor de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). La actividad superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces (143).

2.5.2.3.- Glutación peroxidasa.

Es una macromolécula tetramérica cuyo peso molecular se sitúa entorno a los 85.000 D. Cada una de las subunidades contiene un átomo de selenio (147). Cataliza la reducción de hidroperóxidos con el consumo de glutatión:



En 1957, Mills habló de la glutatión peroxidasa como una enzima eritrocitaria que "protegía" a la hemoglobina de su ruptura oxidativa (148). Años más tarde se comunicó la protección que sobre los glóbulos rojos producía la glutatión peroxidasa, ante los daños oxidativos de los radicales libres del oxígeno (149). La glutatión peroxidasa se encuentra tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial (122, 150). El átomo de selenio es esencial para su

actividad (150). De hecho, la deficiencia en la dieta en selenio produce una drástica disminución de la actividad glutatión peroxidasa en todos los tejidos (147) y la deficiencia en glutatión peroxidasa da una clínica similar al favismo (deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa).

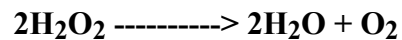
Las principales características de la glutatión peroxidasa son la alta especificidad que presenta por el dador de electrones (el GSH), y la baja especificidad respecto al hidróperóxido (147).

2.5.2.4.- Catalasa.

Junto con la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa, es la enzima encargada de completar el mecanismo de defensa contra los daños oxidativos en las células.

Presenta dos tipos de actividades (151):

a) Actividad catalasa: Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar agua y oxígeno:



b) Actividad peroxidasa. Oxidación de dadores de hidrogeniones como el metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles, con el consiguiente consumo de peróxidos:



Es una proteína de un peso molecular aproximado de 240.000 D y contiene 4 grupos de ferroprotoporfirina por molécula, con un contenido en hierro aproximado del 0.09%.

La actividad catalasa varía enormemente en función del tejido, así es muy elevada en hígado y riñón, y muy escasa en el tejido conectivo (151). Intracelularmente se localiza en los peroxisomas, aunque en el eritrocito se encuentra en la fracción soluble del citoplasma (152).

Fisiológicamente, la catalasa cumple un papel fundamental en la detoxificación del agua oxigenada producida por algunas enzimas localizadas en los peroxisomas, como la aminoácido oxidasa. En el eritrocito, la catalasa, junto a la glutatión peroxidasa, actúa como protector de la hemoglobina y otras proteínas ricas en grupos tiólicos frente a la oxidación.

En resumen podemos decir que los sistemas de defensa enzimáticos se encargan de eliminar el anión superóxido (superóxido dismutasas) y el peróxido de hidrógeno (glutatión peroxidasa y catalasa) con el fin de evitar, por una parte, el daño oxidativo que pueden ocasionar estos productos *per se* y por otra, la formación de productos mucho más tóxicos como el radical hidroxilo, que puede ser muy dañino para los sistemas biológicos.

2.5.2.5.- Vitamina C

La vitamina C es el ácido ascórbico. Se trata de una vitamina hidrosoluble que se caracteriza porque cede con facilidad dos electrones, dando lugar al dehidroascórbico. Este hecho es el que le proporciona sus características antioxidantes.

La forma reducida de la vitamina C puede neutralizar directamente al ion superóxido al radical hidroxilo, y al oxígeno singlete (153). También es capaz de regenerar la forma oxidada de la vitamina E (154). Además se da una interrelación entre el GSH y el

ácido ascórbico, ya que existen transhidrogenasas, como la glutarredoxina, capaces de reducir el ácido deshidroascórbico con el consumo de GSH (155).

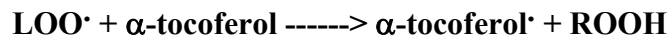
Debemos tener en cuenta que ni el hombre, ni algunos primates superiores, ni la cobaya, lo pueden sintetizar, por lo que ha de formar parte de la dieta. La ingesta recomendada es de unos 200 mg por día (156).

2.5.2.6.- Vitamina E

La forman un conjunto de nutrientes liposolubles esenciales que tienen como estructura base el tocoferol, o el tocotrienol (157). El más activo y frecuente es el α -tocoferol.

El α -tocoferol puede interaccionar directamente con los radicales peroxilo e hidroxilo (158, 159). También puede neutralizar al radical superóxido (158, 160).

Al ser una estructura liposoluble, su principal función es la de la protección de las membranas biológicas frente a la oxidación (161). Inhibe la fase de propagación en la cadena de la lipoperoxidación (162), formándose el radical tocoferoxílico:



Este radical es relativamente estable, ya que el electrón desapareado se puede deslocalizar en la cadena aromática (162). El radical tocoferoxílico se puede reducir dando lugar a la forma activa de la vitamina E en reacciones con la vitamina C (114) o con el GSH (163). Otras posibilidades de eliminación del radical tocoferoxílico son la reacción con otro radical tocoferoxílico para dar lugar a un

dímero (163), o con un radical peroxílico para dar lugar a un aducto estable (164).

Es más, la vitamina E previene muchos de los síntomas que aparecen en la deficiencia en selenio y viceversa.

2.5.2.7.- Carotenoides.

Los carotenoides son un conjunto de pigmentos aislados de plantas y algunos de ellos como el α , β o γ caroteno son precursores de la vitamina A. El más frecuente e importante es el β -caroteno

El β -caroteno posee actividad antioxidante (165). Sin embargo la vitamina A no posee esta actividad. El β -caroteno se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza .

2.5.2.8.- Bilirrubina

La bilirrubina es el producto final de la degradación del grupo Hemo. Es un antioxidante liposoluble y por tanto capaz de inhibir la lipoperoxidación. Se le considera como un antioxidante de una gran importancia fisiológica (166)

2.5.2.9.- Ácido úrico

Es el producto final del catabolismo de las bases púricas en aquellas especies, como el hombre o los primates, que no presentan actividad uricasa.

Es hidrosoluble y presenta una potente acción antioxidante en medio acuoso (167, 168). De hecho, la elevada longevidad del ser humano y de los primates se ha relacionado con los altos niveles de

ácido úrico que presentan estas especies (167, 169). Otro dato interesante es que más del 30% de la capacidad antioxidante del plasma del ser humano se debe al ácido úrico (170).

Aparte de la acción directa del ácido úrico sobre los radicales libres, se ha observado que inhibe la xantina oxidasa (171), por lo que también actúa sobre uno de los mecanismos más importantes de generación de radicales libres.

2.5.2.10.- Otros antioxidantes.

Además de los ya comentados, existen otras muchas biomoléculas que pueden actuar o actúan como antioxidantes. Vamos a destacar a las quinonas, como el coenzima Q. La forma reducida de este coenzima se ha observado que inhibe la peroxidación lipídica (172).

Otro grupo estaría formado por proteínas secuestradoras de metales pesados como la transferrina, la ceruloplasmina o la lactoferrina. Estas proteínas, al secuestrar al metal pesado, evitan la acción catalítica de los mismos en la descomposición de hidroperóxidos con la consiguiente formación de radicales libres (173). Dentro de este grupo también estaría la albúmina por su alta capacidad para transportar cobre (174).

La cisteína y la cisteamina también actúan como antioxidantes. La cisteína puede actuar igualmente como prooxidante debido a su fácil autooxidación, y en este proceso genera radicales libres (32).

2.6.- ESTRÉS OXIDATIVO. CONCEPTO.

El estrés oxidativo se puede definir como una perturbación del equilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en favor de los prooxidantes (121), de tal forma que esta alteración puede dar lugar a cambios en las biomoléculas y, por tanto, modificaciones en su función.

2.7.- INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR RADICALES LIBRES.

Dada la importancia en la patología de los radicales libres derivados del oxígeno en los últimos años, se ha intentado buscar índices del daño producido por los mismos. Entre los muchos propuestos vamos a destacar los siguientes:

2.7.1.- Estatus del glutatión.

El GSH puede neutralizar directamente los radicales libres derivados del oxígeno, o evitar su formación reduciendo los hidroperóxidos a alcoholes en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. En ambos casos el producto formado es el glutatión disulfuro u oxidado (GSSG; 2 moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro). Un daño oxidativo llevará consigo un aumento de la concentración de GSSG y una disminución del cociente GSH/GSSG, y por tanto a esta relación se la puede considerar como índice de estrés oxidativo.

Sin embargo, existen problemas metodológicos en la determinación correcta del GSSG. Estos problemas se deben, por una parte a que en condiciones fisiológicas la concentración de GSH es mucho mayor que la de GSSG de 2 a 3 órdenes de magnitud; (134) y,

por otra parte, a la fácil autooxidación del GSH, sobre todo en presencia de metales pesados (21). Por tanto, una pequeña autooxidación del GSH durante el procesado de la muestra llevará consigo un aumento muy importante en los niveles de GSSG. Estos problemas se han conseguido solucionar gracias al bloqueo del grupo tiol, para evitar su autooxidación, con N-etilmaleimida (21).

2.7.2.- Malondialdehído.

La degradación de los lipoperóxidos da lugar a múltiples productos terminales entre los que destaca el malondialdehído. La cuantificación del mismo se ha utilizado como un índice del daño oxidativo a lípidos.

Se han descrito varios métodos para la determinación del malondialdehído (175). El problema de la mayoría de estos procedimientos es que son poco específicos ya que utilizan al ácido tiobarbitúrico como reactivo, y éste reacciona con todos los aldehídos presentes en la muestra. Estos métodos se han conseguido mejorar gracias a una separación por cromatografía líquida de alta eficacia del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que pueden interferir en la determinación (176). Otro problema adicional es la inestabilidad del MDA en solución debido a su gran volatilidad. Hoy en día se prefiere efectuar la determinación de los niveles de lipoperóxidos en muestras biológicas. Como índice del nivel de lipoperóxidos se ha utilizado el MDA producido por la hidrólisis *in vitro* de los mismos (177).

2.7.3.- Pentano y etano en el aire espirado.

El etano y el pentano son dos alcanos volátiles que se forman como productos terminales en la lipoperoxidación de los ácidos grasos

omega-3 y omega-6 poliinsaturados (178). Estos dos alcanos, al ser volátiles, se eliminan vía pulmonar y se pueden cuantificar por cromatografía de gases. Al tratarse de una técnica no invasiva, la cuantificación de estos alcanos se ha utilizado mucho en seres humanos como índice de la peroxidación lipídica (179, 180).

2.7.4.- 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina.

El radical hidroxilo, debido a su gran reactividad, puede atacar a todos los componentes del ADN dando lugar a múltiples productos terminales (28, 119). Los más estudiados son las modificaciones de las bases nitrogenadas. Así por ejemplo, se ha observado que la exposición de las células a un daño oxidativo produce un aumento en el contenido de 8-hidroxiguanina en el ADN (181). Es más, se ha utilizado la excreción urinaria de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina como un índice del daño oxidativo al ADN *in vivo* (182).

2.7.5.- Determinación de grupos carbonilos en proteínas.

Una de las consecuencias del ataque de los radicales libres derivados del oxígeno a las proteínas es la introducción de grupos carbonilos en las cadenas laterales de los aminoácidos (94). Levine y cols. (1990) han revisado varios métodos para la cuantificación de estos grupos carbonilos. El método más utilizado es el que se basa en la reactividad de la 2,4- dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilos para formar 2,4- dinitrofenilhidrazona y posterior cuantificación espectrométrica. Se ha observado que en situaciones donde se produce una lesión oxidativa, se incrementa el contenido en grupos carbonilos de las proteínas. Así por ejemplo, la exposición de ratas a una atmósfera de un 100% de oxígeno durante 48 horas triplica el contenido de grupos carbonilos de las proteínas hepáticas.

2.7.6.- Peróxido de hidrógeno en aire espirado.

La determinación directa del peróxido de hidrógeno en el condensado del aire espirado es un marcador de la existencia de un daño oxidativo a nivel pulmonar. Así, por ejemplo, se ha observado que en adultos con distrés respiratorio hay un aumento significativo del peróxido de hidrógeno en el aire espirado respecto a controles (183).

2.8.- PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LOS RADICALES LIBRES.

Conforme se ha ido profundizando en el conocimiento de los radicales libres, se ha descubierto que muchas patologías en el ser humano están mediadas por daños producidos por los mismos. Entre éstas debemos destacar el enfisema (4, 184), el cáncer (185), la artritis (186), la arteriosclerosis (187), la cirrosis (188), la catarata (189) el distrés respiratorio en el adulto (26), las complicaciones patológicas del diabético (190), enfermedades neurodegenerativas (191), SIDA(192) y en el envejecimiento (193, 194).

3.- ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES MELLITUS.

3.1.- GENERALIDADES

En los últimos 20 años se ha empezado estudiar el posible papel de los radicales libres en la fisiopatología de la diabetes. Así pues, Oberley en 1988 (195) ya correlaciona el estrés oxidativo con la diabetes. La mayoría de los autores postulan el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de las complicaciones diabéticas debido al daño tisular que producen los radicales libres (196). Así, por ejemplo, se sabe que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la neuropatía diabética (197), en la nefropatía diabética, y en las complicaciones cardiovasculares (198).

Existen varias vías para explicar la patogénesis de las complicaciones de la diabetes. Estas vías incluyen la glicación no enzimática y autooxidativa, alteraciones de la vía del sorbitol, alteraciones de los sistemas antioxidantes, daño tisular producido por procesos de isquemia reperfusión, procesos inflamatorios y alteraciones del metabolismo. Baynes y colaboradores en 1991 (196) postula que el estrés oxidativo es el nexo de unión de todas las vías propuestas en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes.

Sin embargo, existen algunos autores que implican a los radicales libres no tan sólo en las complicaciones del diabético, sino también en la misma etiología de la diabetes (199). Esto se extrae a partir del estudio de varios fármacos inductores de diabetes en animales de experimentación, como la estreptozotocina y el aloxano, que destruyen selectivamente los islotes de Langerhans pancreáticos por un mecanismo oxidante, y su acción puede ser inhibida por la administración de antioxidantes (195, 199).

Existen numerosos datos experimentales que evidencian un aumento de los parámetros de estrés oxidativo en diabéticos. En este sentido se ha observado una oxidación del glutatión en sangre total (200), en plasma de diabéticos tipo 2 (201), en eritrocitos de pacientes diabéticos tipo 1 y en cristalino de ratas diabéticas (202).

También se ha observado una disminución de vitamina C, y un aumento de su forma oxidada (ácido deshidroascórbico), en ratas diabetizadas con estreptozotocina (203). Estos autores atribuyen esta oxidación del ácido ascórbico a una falta de reciclaje del mismo, ya que han observado una disminución en la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y, por tanto, una falta de NADPH necesario para la regeneración del GSH vía glutatión reductasa. Debemos tener en cuenta que el GSH actúa como cofactor en la reducción de la forma oxidada de la vitamina C (130)

También se ha detectado un aumento de los niveles de TBARS en suero de pacientes diabéticos, aunque otros estudios sugieren que los niveles de lipoperóxidos en plasma están más relacionados con la hipertrigliceridemia que con la diabetes (204). En eritrocitos de pacientes diabéticos se ha observado un aumento de la peroxidación lipídica, y este aumento se correlaciona directamente con los niveles de hemoglobina glicosilada lo cual sugiere que el daño oxidativo puede estar relacionado con la hiperglucemia *per se*. En un modelo experimental de diabetes, como son las ratas diabetizadas con estreptozotocina, se ha observado un aumento de la peroxidación lipídica en eritrocitos (205).

Otros estudios se han centrado en el daño oxidativo a nivel del DNA. Así por ejemplo se han detectado unos niveles elevados de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina en linfocitos humanos, tanto de diabéticos

tipo 1 como tipo 2 (206). Además, Liang y cols. (1997) han encontrado deleciones en el DNA mitocondrial del músculo de pacientes con intolerancia a la glucosa respecto a un grupo control de la misma edad (207). Se ha observado un aumento de los restos de N-carboximetil lisina en el colágeno humano asociado a la diabetes y al envejecimiento. La N-carboximetil lisina se produce a partir del complejo fructosa-restos laterales de lisina de las proteínas (ver figura I.6.).

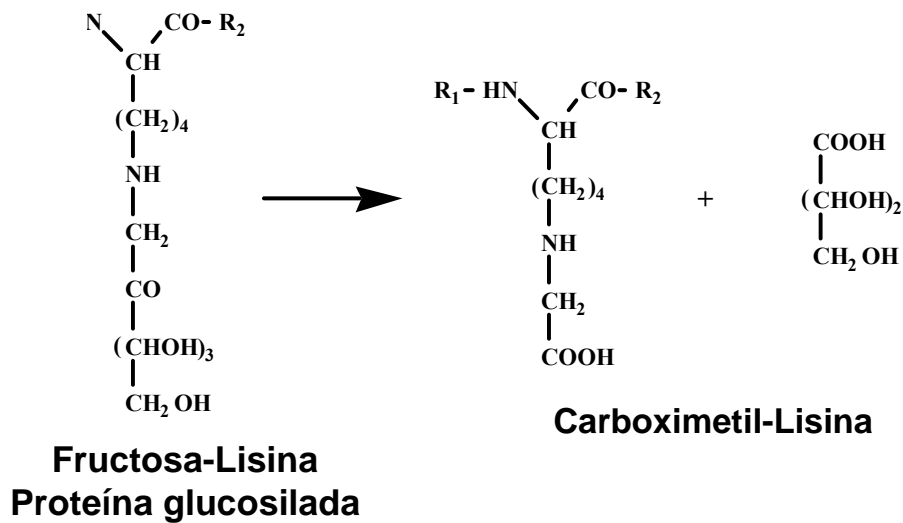


Figura I.6. Producción N-carboximetil lisina

Para esta reacción es necesario oxígeno y en el mecanismo de la misma está implicado tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno. Como la formación de restos de carboximetil lisina en las proteínas es una modificación irreversible, sus niveles se han utilizado como un biomarcador acumulado de estrés oxidativo. Sin embargo, otros autores (208) que también observaron un incremento de restos de N-carboximetil lisina en el colágeno de la piel de los diabéticos, no detectaron en el mismo variaciones asociadas a la

diabetes, ni movimientos en los niveles de orto-tirosina (un biomarcador del ataque del radical hidroxilo sobre las proteínas), ni en los niveles de sulfóxido de metionina (derivado de la metionina que se forma bajo condiciones oxidantes). En este mismo estudio sí que se observó un aumento de estos marcadores asociado a la edad de los sujetos estudiados. Wells-Knecht y sus colaboradores en este trabajo ponen en tela de juicio la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes (208).

3.2.- FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DURANTE LA DIABETES.

3.2.1. Papel de la hiperglucemia.

La glucosa, como otros muchos substratos, es propensa a la oxidación, incluso en condiciones fisiológicas. Esta circunstancia por sí sola ya hace pensar en un vínculo entre diabetes y estrés oxidativo, vínculo que establecen diversos autores, en el hombre y otras especies (209, 210). La glucosa puede autooxidarse (enolizarse) (209, 211) y genera radicales libres (196, 210). En la hiperglucemia mantenida (ej. diabetes mellitus) y en presencia de un metal de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+}), produce un radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que desencadena la reacción genérica.(209).

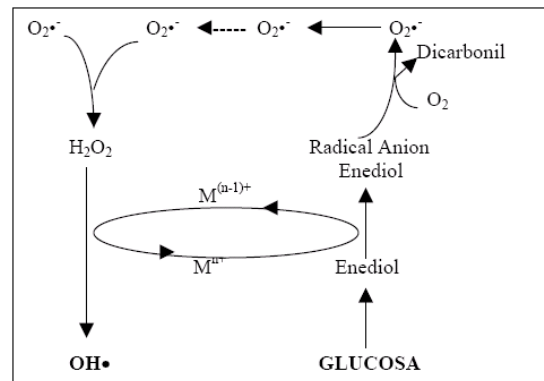


Figura I.7. Oxidación de la glucosa y producción de oxidantes.

La vía general por la que se incrementa el estrés oxidativo puede contribuir al desarrollo de las complicaciones en la diabetes. Intermediarios como superóxido, peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos, son precursores de muchas especies reactivas del oxígeno como el radical hidroxilo.

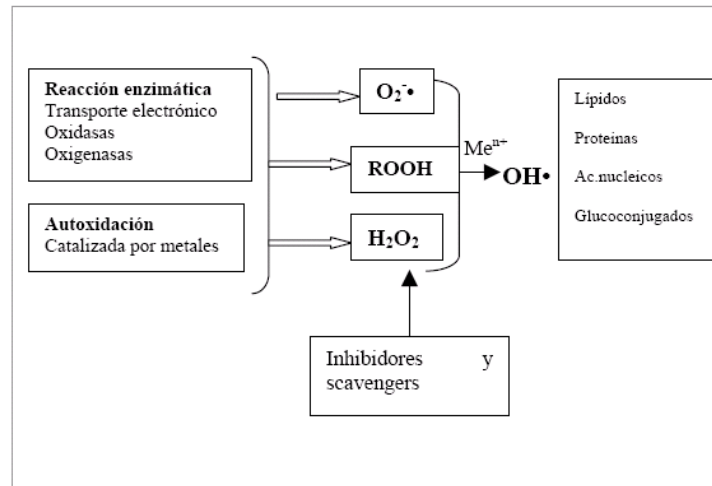


Figura I.8. Generación de ERO en la hiperglucemia

El exceso de glucosa iniciaría la *glicosilación no enzimática* de las proteínas (212), fundamental en muchas complicaciones diabéticas, como son la micro y macrovasculopatías, debidas a la producción de Advanced Glycation Endproducts (AGE) (213, 214). Evidencias experimentales revelan la asociación entre estrés oxidativo e hiperglucemia, mostrando la presencia en el plasma de sujetos diabéticos el incremento de sustancias ácido-tiobarbitúricas e hidroperóxidos lipídicos (213, 214), dos marcadores clásicos de la peroxidación lipídica.

El mecanismo molecular de la oxidación biológica de la glucosa fue identificado en 1912 como “*Reacción de Maillard*”. Esta reacción explica la modificación covalente no enzimática de las

proteínas que acompaña al estado de hiperglucemia. Se produce la combinación del grupo aldehído de la glucosa con los grupos amino de las proteínas para formar la base de Schiff seguida del reordenamiento de Amadori para formar fructosa-lisina. Esta glicosilación reversible de los grupos amino, o *glicación*, sirve de base para la formación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), reconocido marcador del control de la glucemia en la diabetes mellitus. El estadio final de la reacción de Maillard conlleva una oxidación irreversible o *glicoxidación* de la fructosa-lisina para producir los principales productos AGE (215). La formación de estos productos se correlaciona directamente con las complicaciones renales y vasculares de la diabetes mellitus. Modificaciones en la vida media de las proteínas extracelulares (colágeno, elastina, mielina...) y cambios estructurales en los tejidos ricos en estas proteínas (pared vascular, membranas basales, lente ocular...) están asociados al desarrollo de complicaciones en la diabetes, como cataratas, microangiopatía, aterosclerosis y nefropatía.

La hiperglucemia mantenida causa diversas complicaciones bien conocidas en las que están involucradas la activación de la vía de los polioles (216) especialmente importante en la aparición de la neuropatía (217).

Dicha activación produce incremento del cociente NADH/NAD (pseudohipoxia hiperglucémica) y disminución del cociente NADPH/NADP, lo que produce estímulo de la vía de la ciclooxigenasa (activación de la síntesis de prostaglandinas) y depresión del ciclo redox del glutatión, respectivamente (218). La afectación añadida de proteínas estructurales y enzimas, como la SOD-Cu,Zn dependiente, que disminuye su actividad (190), producen la disminución de la capacidad antioxidante encontrada en los

diabéticos. Por otro lado, el daño a nivel del ADN, detectable por incrementos en los niveles de 8-oxo 2'-desoxiguanidina (8oxodG) urinario (219), parece acompañar a la aparición de complicaciones diabéticas.

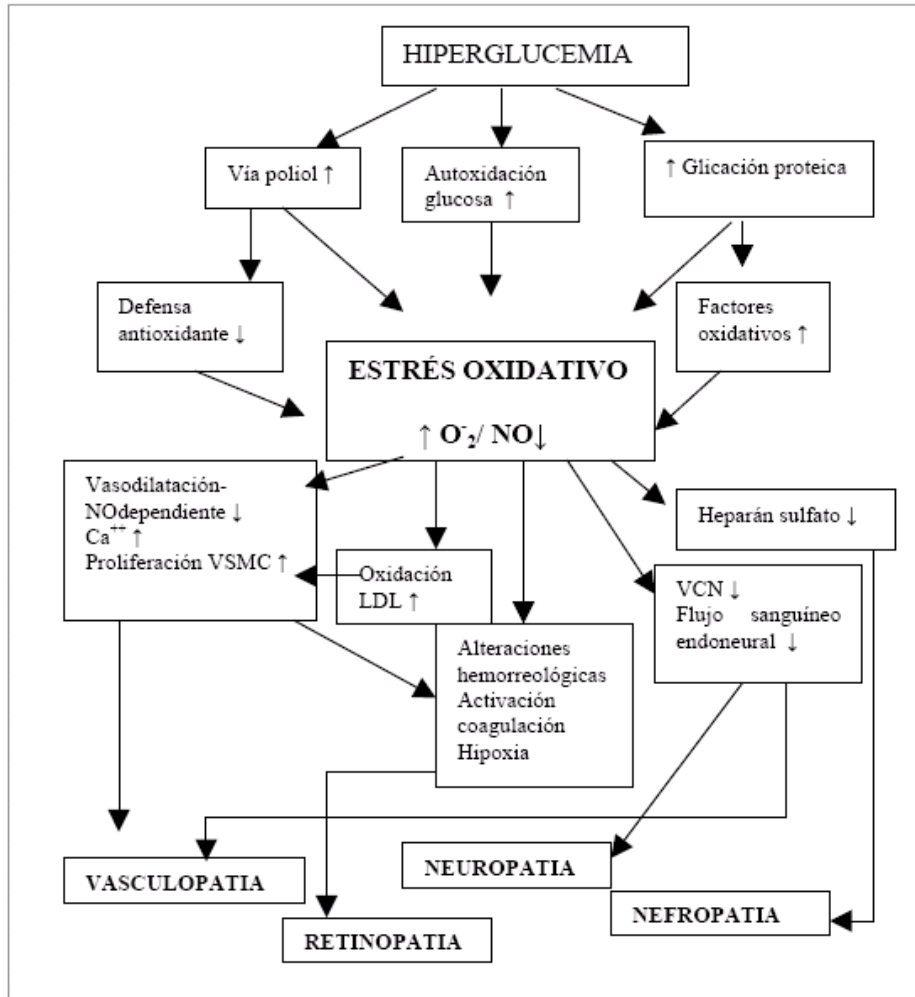


Figura I.9.: Posible relación entre estrés oxidativo inducido por hiperglucemia y complicaciones diabéticas.

El círculo vicioso que establece hiperglucemia, este oxidativo y grado de glicosilación no enzimática parece estar fundamentalmente

mantenido por el estado de estrés oxidativo existente. De ahí que en la última década haya cobrado importancia la terapéutica antioxidante como preventiva o coadyuvante en el tratamiento de los procesos que conducen a incrementar dicho estrés. La administración de antioxidantes en la diabetes mellitus se haya justificada por la demostrada caída de la reserva antioxidante y la menor eficacia de los sistemas antioxidantes celulares y plasmáticos.

Entre los inhibidores de este estrés oxidativo se incluyen enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas, que limitan la acumulación de precursores. Proteínas como transferrina, ceruloplasmina y albúmina también funcionan como inhibidores por limitar la concentración de iones metálicos de transición, los cuales son catalizadores de las reacciones de oxidación. Los barredores de radicales limitan el daño del radical hidroxilo por atrapamiento de radicales reactivos en zonas hidrofílicas y lipofílicas de las membranas. Barredores solubles en agua incluyen el ácido ascórbico, glutatión y ácido úrico; barredores liposolubles incluyen la vitamina E y ubiquinol. Se han ensayado otras sustancias con efecto antioxidante (220), destacando la melatonina, el ácido lipoico, vitamina A, vitamina C, butil-hidroxitolueno, polifenoles dietéticos, fármacos como el captopril, alopurinol, manitol, desferroxiamina, etc

3.2.2. Papel de la xantina oxidasa.

El papel de la xantina oxidasa en la disfunción vascular que se produce en la arteriosclerosis fue estudiada por White y cols. (80). Utilizando anillos aórticos de conejos diabéticos nuestro grupo de investigación demostró que la producción de superóxido también aumenta en las arterias de estos animales (221). La xantina oxidasa se une a las células del endotelio vascular por glicosaminglicanos (85).

El tratamiento con heparina provoca la liberación de la enzima de la pared de los vasos y disminuye, de esta forma, la producción de superóxido en las arterias de los animales diabéticos (221). El hecho de que la producción de esta especie reactiva esté incrementada en la pared de los vasos de los animales diabéticos puede ser relevante a la hora de explicar algunas de las complicaciones vasculares de la diabetes. Incrementos de actividad de xantina oxidasa se han observado en el plasma en pacientes con diabetes de tipo 2. (222)

La enzima xantina óxidoreductasa (XOR) es una enzima descrita originalmente como una aldehído oxidasa en 1902. Está ampliamente distribuida entre seres vivos de distinta complejidad, habiéndose demostrado su existencia desde organismos tan sencillos como las bacterias hasta los mamíferos más evolucionados como el hombre.

La familia de las xantina oxidasa está formada por α_2 homodímeros de tipo molibdeno-flavonoproteico. Cada monómero está organizado en distintos dominios.

El prototipo de la familia molibdenopterinas y de la familia xantina oxidasa es la xantina oxidoreductasa (XOR).

La estructura tridimensional de la XOR se parece a una “mariposa” (Figura I.10. A y B). Un dímero está formado por dos monómeros de 150 kDa. Cada monómero contiene en concreto 3 dominios:

- El dominio N-terminal representado por el grupo $[\text{Fe}_2\text{S}_2](\text{S}_y\text{Cys})_4$, de 20 kD, situado entre los amino ácidos (aa)1-165, está formado por dos centros $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{I}$ y $\text{Fe}_2\text{S}_2\text{II}$.

- El intermedio representado por el flavín adenin dinucleótido (FAD), de 40 kD. Situado entre aa.226-531
- El dominio C-terminal es el centro molibdeno cofactor (Mo-Co), de 85 kD. Situado entre aa.590-1332 (Hill).

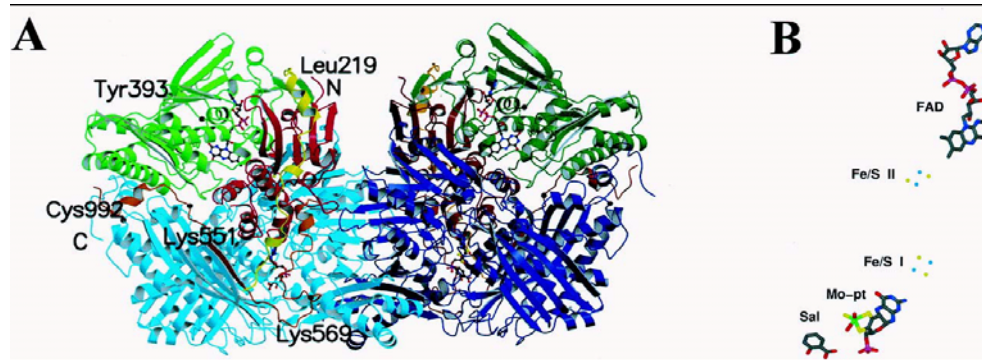


Figura I.10A Estructura tridimensional de la XOR. Los colores representan los dominios: en marrón Fe₂S₂, en verde FAD y en azul el Mo

Figura I.10B Orientación relativa de los dominios. El código de colores para los átomos es: C-blanco, N- azul, O-rojo, S-amarillo, Fe-verde, Pmorado, Mo-marrón(Enroth C., *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 97, 10723 10728, 2000).

La actividad de la XOR ha sido detectada desde bacterias hasta mamíferos (76). La mayoría de los datos obtenidos sobre la distribución de la enzima XOR en distintos tejidos y células, se han hecho en animales como ratas (223) y ratones (224).

La actividad enzimática varía en función del tejido (225). Cantidades importantes de la enzima se encuentran en el hígado (76) y en la porción proximal del intestino delgado, el duodeno y el yeyuno (224). La misma distribución está demostrada en el intestino humano (226), pero menos en comparación con otros mamíferos.

Se ha detectado XOR en el cerebro y el corazón humano (227) implicándose su actividad en el daño celular durante el proceso de isquemia y reperfusión cardíaco y en algunas enfermedades neuronales (228)

En humanos la XOR ha sido detectada también en hepatocitos, células de Kupffer, en riñón y en las células epiteliales de la glándula mamaria (226) y del ducto biliar (229)

La enzima se localiza también en líneas celulares de macrófagos y mastocitos (227).

La XOR está presente en el endotelio capilar de distintos órganos y tejidos, como yeyuno (230), músculo esquelético (227), riñón (230) y glándula mamaria (231). Se ha demostrado que la XOR se adhiere al endotelio capilar inerte y parece que interacciona con proteoglicanos ricos en condroitín sulfato (232, 233). Una vez unida a la membrana celular de células endoteliales, la XOR se incorpora al interior celular por endocitosis. La unión de la XOR es inespecífica y reversible, la cinética del proceso es comparable con la de otras moléculas que se unen específicamente al endotelio (234). La unión de la enzima a la superficie celular está respaldada por la demostración tanto de la enzima como de las consecuencias de su actividad en tejidos que originalmente presentan poca actividad XOR, de forma que tras aumentar la liberación de esta enzima en otros órganos, aquellos presentan un incremento de daño producido por la XOR transportada a través de la sangre (79, 235) y además estos órganos son protegidos por inhibidores de la XOR (236, 237). Así pues, la XOR liberada desde órganos isquémicos es capaz de producir efectos en órganos a distancia, como el pulmón (238).

En plasma la XOR circula como XO debido a la conversión de XDH a XO por la acción de proteasas plasmáticas. Los niveles plasmáticos de XO en condiciones normales (por HPLC), en los seres humanos, son de 0-0,5mU/l. La fluorescencia establece unos niveles de 0,21 +/- 0,1mU/l (239). Los niveles aumentan en condiciones patológicas, relacionadas en especial con la patología de los órganos que más XO tiene, como es el hígado o el intestino. Los niveles

circulantes de XO aumenta 1000 veces en la fase aguda de la hepatitis vírica aumenta menos en hepatitis crónica y cirrosis.

Los niveles plasmáticos aumentan también en otras enfermedades como artritis reumatoide, esclerodermia, aterosclerosis etc (240).

La actividad de la enzima aumenta tras la isquemia-reperfusión de la región esplácnica o tras shock hipovolémico, pero si además se administra una perfusión intravenosa de heparina, aún aumenta más (84). El desplazamiento de la unión de la XO ante la presencia de heparina, se atribuye a la capacidad de ésta para unirse a sitios catiónicos de la XO, compitiendo así la heparina con el condroitín sulfato y otros glicosaminglicanos. Por otra parte, la unión de la XO a la superficie celular influye en las propiedades catalíticas, en la capacidad de producir agentes oxidantes y en la estabilidad de la propia XOR (241). Un proceso similar sufre la enzima cuando es liberada al plasma, cambiando sus propiedades. La XOR antes de ser liberada por las células, contiene cierta actividad XDH, y al liberarse al plasma se convierte inmediatamente en XO (171). Por lo tanto, tanto la liberación de la enzima a la circulación como la siguiente unión a las células promueven la producción de ERO.

Además de circular por el plasma de forma libre, la enzima circula también formando inmunocomplejos. De hecho, la actividad XO en plasma humano es escasamente detectable en condiciones normales (236, 242).

La actividad catalítica de la enzima está dada por su estructura. La vía más conocida es la de la degradación purínica, descrita por Parks y Granger en 1986 (76). La XOR convierte la hipoxantina en

xantina y la xantina en ácido úrico, el producto final en el catabolismo purínico en humanos.

El mecanismo de la transferencia electrónica del XDH a NAD^+ no se conoce completamente, parece que la XDH tiene que estar reducido por 4 electrones, encontrándose en la forma XOR 4^e^- (243)

El radical superóxido producido, tanto por la XO como la XDH, puede reaccionar con el agua y formar H_2O_2 , o bien con el óxido nítrico (NO), producido por la misma enzima y formar el peroxinitrito, como se muestra en el siguiente esquema os acercáis (Figura I.11.).

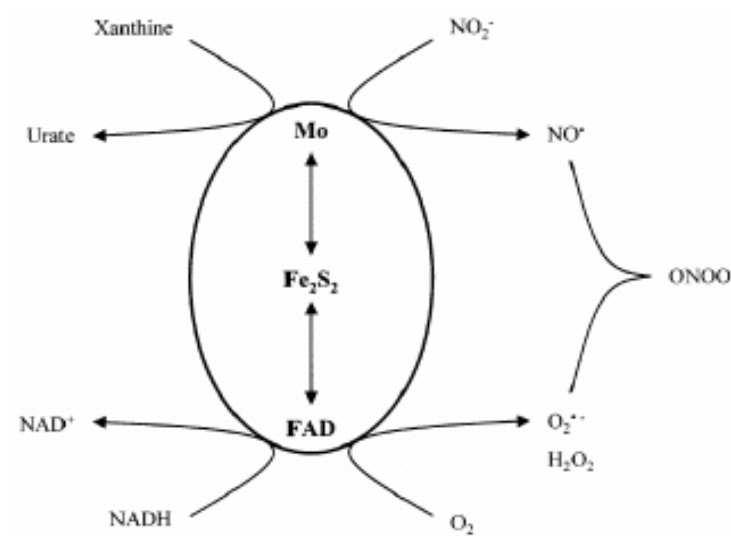


Figura I.11. La XOR cataliza la producción de NO y peroxinitrito (*Harrison RFRBM Vol33,no6,2002*)

La XOR es una fuente importante de ERN. Genera NO en especial en condiciones de hipoxia, cuando la NOS no genera NO (244).

La isquemia-reperfusión se considera otro factor en la regulación de la enzima, habiéndose demostrado que ésta provoca un

aumento de la actividad de la XOR (245, 246), así como un aumento en los niveles mARN (245, 246) y de la expresión de la proteína *in vivo* (247) e *in vitro* (246). Durante el proceso de isquemia los niveles celulares de ATP disminuyen, tanto por el descenso en su producción como por su rápida defosforilación a ADP. Éste es degradado vía adenosina e inosina a hipoxantina. Debido a la depleción del ATP se produce una desregulación de los canales ATP-dependientes y un aumento del Ca^{+2} intracelular. Como consecuencia de este incremento, se produce la activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} responsables de la conversión de la XDH en XO (74). Durante la repercusión y debido a la acumulación del sustrato y de la xantina oxidasa en los tejidos isquémicos, se inicia una cascada de reacciones cuyo resultado es un gran aumento en la formación de radicales libres

El alopurinol es un análogo estructural de la hipoxantina, conocido desde hace 30 años como inhibidor de la XDH, siendo hoy en día utilizado en el tratamiento de la hiperuricemia (248). Su administración previene el daño tisular postisquémico, inhibiendo la actividad de la XOR. El alopurinol se fija del dominio Mo-Co de la enzima e inhibe la reacción de la misma con el sustrato (71, 249).

4.2.3. Papel de la óxido nítrico sintasa (NOS)

A mediados de la década de los ochenta el óxido nítrico fue identificado como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) implicando su importancia en el sistema cardiovascular y en casi todos los demás sistemas biológicos, motivo por el cual fue escogida como la molécula del año en 1992 por la revista Science y mereció el que se le otorgara el premio Nobel en medicina y fisiología en 1998 a los investigadores pioneros de tan importante descubrimiento: Ferid Murad, Robert Furchgott y Louis Ignarro.

Como hemos comentado en apartados previos de la introducción, el NO es considerado un gas de fácil difusión con características de radical libre (electrón no apareado), producido en forma endógena por una gran variedad de células. Es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina a través de una compleja reacción catalizada por el enzima óxido nítrico sintetasa. El óxido nítrico participa en una variedad de importantes funciones biológicas incluyendo neurotransmisión, vasodilatación, inmunotoxicidad y transducción de señales. Numerosos estudios de diferentes laboratorios han implicado al NO en la modulación de una variedad de alteraciones inflamatorias agudas y crónicas, pero también existen evidencias sobre su capacidad de actuar como agente inflamatorio al regular la expresión de moléculas como ICAM-1 o VCAM-1. De igual modo, el NO tiene un papel importante en el mantenimiento del tono vascular, pero en condiciones patológicas puede inducir un cuadro de shock hipotensivo y mediar procesos apoptóticos y necróticos (250). Esta molécula es sumamente reactiva y de alta capacidad combinatoria, y se encuentra presente en numerosos sistemas y procesos fisiopatológicos.

La síntesis de NO en sistemas biológicos está determinada por una familia de enzimas que son llamadas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han identificado tres tipos de NOS (Tabla I.6) y cada isoforma puede tener distintas localizaciones celulares. A modo de ejemplo podemos indicar como la isoforma purificada y clonada en las neuronas (nNOS) se encuentra también expresada en el músculo esquelético, en los neutrófilos, en los islotes pancreáticos, en los endotelios y epitelios del aparato respiratorio, y en las vísceras del tracto gastrointestinal. La isoforma endotelial (eNOS) que fue purificada y clonada en las células endoteliales también puede expresarse en ciertas poblaciones neuronales del cerebro y en las

plaquetas. Por último, en cuanto a la isoforma inducible (iNOS) que fue purificada por primera vez en los macrófagos, su expresión ha podido ser observada en células de diversos tipos, tales como las células musculares lisas y las células endoteliales y recientemente en un pequeño número de neuronas situadas en el hipocampo, en el cerebelo, corteza y otras áreas del cerebro de ratas adultas normales, teniendo además esta isoforma características diferentes entre las expresadas por diferentes tejidos de una misma especie.

Las tres isoformas de NOS son hemoflavoproteínas que utilizan L-arginina como sustrato y requieren NADPH, dinucleotido de flavina-adenina (FAD) y tetrahidrobiopterina (3HB) como cofactores. La enzima NOS II es inducible e independiente de Ca^{2+} intracelular, mientras la NOS I y III son Ca^{2+} dependientes y constitutivas. La NOS inducible se hace presente y multiplica su actividad en procesos generalmente patológicos, genera un compartimento de NO que gobierna procesos de muerte celular, inflamación, shock séptico, destrucción pancreática autoinmune, etc.

TABLA I.6. ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS (NOS).

Propiedad	NOS I	NOS II	NOS III
Nombre	bNOS, cNOS, nNOS	iNOS, mNOS	eNOS
Tejido preferencial donde se expresa	Neuronal, epitelial.	Macrófagos, Musculatura lisa, , etc.	Endotelio
Expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva/variable
Requerimientos de Ca^{++}	Si	No	Si
Cromosoma	12	17	7
Tamaño	150-160 kDa	125-135 kDa	133 kDa

Como hemos comentado en este apartado, en la diabetes, se ha encontrado una relación directa entre el mal control metabólico y la presencia de hiperglucemia con respecto al incremento de estrés oxidativo del organismo, con elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en todos los sistemas estudiados. Asimismo, se encuentra ampliamente descrito un incremento en los niveles de NO en tejidos reproductivos diabéticos, el cual, asociado a la presencia de ERO, provoca una alta concentración de peróxidos de nitrógeno, de efecto igualmente deletéreo (250, 251).

La eNOS es importante en la regulación vascular, manteniendo una vasodilatación adecuada y protegiendo la íntima de los agregados plaquetarios y de la adhesión leucocitaria, además de inhibir la proliferación del músculo liso de la pared. La isoforma nNOS del sistema nervioso central y periférico puede también contribuir a regular la presión sanguínea. En las enfermedades asociadas a hipercolesterolemia, diabetes e hipertensión, que están caracterizadas por una disfunción endotelial, se ve reducida la capacidad de vasodilatación mediada por el endotelio. Por último, el funcionamiento de los vasos y la dinámica circulatoria se ven también alterados por un cambio en la relación entre especies vasodilatadoras y vasoconstrictoras, entre compuestos antiagregantes plaquetarios y aquellos trombogénicos: existen altos niveles de prostanoides, con un incremento en la relación entre tromboxano A₂ y prostaciclina (252, 253).

El NO puede activar a la enzima ciclooxigenasa (COX) en una vía alternativa independiente de GMPC. Esta vía implica un incremento en la síntesis de prostanoides, comprobado en numerosos tejidos y sistemas. La generación de prostaglandinas induce y media la formación de ERO en diferentes tejidos. Se ha demostrado que los prostanoides, el óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno se

regulan positivamente entre sí, lo cual perpetúa el daño pancreático en la diabetes experimental por estreptozotocina y origina la destrucción de las células β en los islotes (254-256).

La liberación de óxido nítrico por la célula β pancreática está regulada también por la presencia de IL-1 β . Esta interleukina proinflamatoria estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la célula, lo cual induce aumento de la concentración de NO, inhibiendo la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (257). Las citocinas pueden llegar a tener efectos sinérgicos; los bajos niveles de IL-1 β son incapaces de inducir la producción de iNOS, pero cuando la misma dosis se combina con IFN- γ se induce la expresión de iNOS en una magnitud similar a la inducida por dosis altas IL-1 β (258). Estos mecanismos regulatorios de la expresión de iNOS tienen mucha relevancia en la diabetes, ya que la aumentada producción de óxido nítrico en esta patología causa una alteración de los mecanismos de regulación del tono vascular y de secreción de insulina (259) (260).

4.2.4. Papel de la ciclooxigenasa (COX).

La formación de las prostaglandinas comienza cuando el ácido araquidónico es liberado de los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de la fosfolipasa A2. La (COX) inicia el primer paso en la biotransformación del ácido araquidónico en prostaglandinas (261). La COX, responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir de un endoperóxido precursor, presenta dos isoformas:

- a. COX1, regula la síntesis de prostaglandinas constitutivas, como la prostaciclina, cuya presencia se encuentra vinculada

con el tono vascular, la hemodinámica y la integridad de la mucosa gástrica.

- b. COX2, inducida por numerosos agentes pro-inflamatorios y vasoactivos, controla la rápida y elevada síntesis de prostanoïdes en procesos activos como inflamación, destrucción celular, parto, apoptosis y necrosis pancreática en la diabetes autoinmune, etcétera.

La COX-1, se expresa constitutivamente en una serie de órganos y tejidos, ejerciendo diversos efectos homeostáticos o de mantenimiento del tracto gastrointestinal y del riñón. Primero, estas sustancias protegen la mucosa gastrointestinal y limitan la secreción de ácido gástrico. Segundo, regulan la hemodinámica renal y el equilibrio de agua y electrolitos. Tercero, estimulan la agregación plaquetaria y por tanto, mantienen la hemostasis normal.

Por otro lado, la COX-2 es considerada una enzima inducible, que responde a estímulos inflamatorios (262).

4.2.6. Otras fuentes de radicales libres en la diabetes

Varias han sido las fuentes de radicales libres propuestas en la diabetes, incluyendo la inducción de las NAD(P)H oxidasa y las óxido nítrico sintasas.

En esta línea el grupo de Cosentino demostraron que los niveles elevados de glucosa aumentan la expresión de la óxido nítrico sintasa en las células del endotelio de la aorta (263). En una serie muy interesante de artículos el grupo de Jain demostró que el aumento de cuerpos cetónicos está asociado a la producción de radicales libres en la diabetes, y que el acetoacetato en presencia de Fe^{2+} puede generar radical superóxido *in vitro* (264).

4. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-κB)

4.1.- GENERALIDADES

El Factor Nuclear κB (NF-κB) es uno de los factores celulares transcripcionales vitales, denominados factores transcripcionales primarios. Siendo una pieza clave en sistemas de respuesta rápida a señales extracelulares desde el exterior hacia el núcleo celular, controla y regula la expresión de distintos genes.

NF-κB tiene una evidente importancia en la respuesta inflamatoria e inmune, en el proceso de proliferación y muerte celular, en la replicación viral, en la producción de óxido nítrico y en la interacción entre células.

Ejemplos de enfermedades inmunes e inflamatorias en las cuales el factor NF-κB está implicado son: el rechazo de los tejidos en el trasplante de órganos sólidos, en la artritis reumatoide, en el asma bronquial (estímulos precipitantes al ataque asmático son al mismo tiempo inductores del factor NF-κB: ozono, óxido nítrico, las infecciones respiratorias virales, distintos tipos de alérgenos).

Muchas enfermedades crónicas están asociadas a la activación aberrante del NF-κB como: aterosclerosis, disfunciones vasculares, esclerosis múltiple, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias óseas, gastritis asociada al *Helicobacter pylori*, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, enfermedad de Alzheimer, shock séptico etc.

La activación o la sobreexpresión del factor NF-κB fue asociada con tumorigénesis y metástasis, de ahí el papel de este factor de transcripción en la regulación de la progresión del ciclo celular. Baldwin (265) demuestra que NF-κB es muy importante en el desarrollo normal del ciclo celular e interviene en la regulación de la

ciclina D1. Algunos tumores expresan de forma constitutiva la activación de NF- κ B: los linfomas con células B y T; leucemia aguda linfoblástica; el cáncer de mama, hígado, tiroides, próstata, colon, ovario, pulmón; mieloma múltiple o el melanoma. Por tanto un número considerable de esquemas terapéuticos anticancerosos tienen como clave la modulación de la actividad de NF- κ B.

Otros datos demuestran a NF- κ B como factor clave en el proceso de isquemia-reperusión miocárdico y en diabetes insulín-dependiente. NF- κ B fue descrito por primera vez por Sen y Baltimore en 1986 (266), como un factor específico presente en linfocitos B, ligado al oligonucleótido decamérico GGGACTTCC de la cadena ligera de la inmunoglobulina (Ig) kappa (κ), que activa la transcripción de los genes Ig κ en células maduras B.

Se comprobó con el tiempo que en realidad es un factor transcripcional ubicuo, con un mecanismo de activación básicamente único (si se considera al propio factor y a su represor), pero que sin embargo responde a una gran cantidad de señales, y activa también a una importante cantidad de genes. (266)

4.2.- COMPONENTES DE NF- κ B

NF- κ B forma parte de la familia de proteínas NF- κ B/Rel que se fijan a las proteínas κ B del DNA. Se presenta como forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (I κ B) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo.

La forma activa es un homo o/y heterodímero de 8 monómeros distintos que pertenecen a dos clases.

La primera clase contiene las proteínas: NF- κ B1, NF- κ B2 y a las proteínas de *Drosophila* (Dorsal, Dif and Relish), responsables de la unión con el DNA (267). NF- κ B1 (p50/p105) es un homodímero

del monómero p50, que se obtiene por la proteólisis del precursor proteico p105, mientras el NF-κB2 (p52/p100) es un homodímero del monómero p52 obtenido por la proteólisis del precursor p100.

La segunda clase denominada proteínas Rel contiene a: RelA (sinónimo del p65). Rel B y c-Rel y son encargados de estimular la transcripción. Las proteínas de la segunda clase en comparación con las de la primera clase no tienen un precursor proteico, ellas se transcriben directamente en forma final.

La dimerización del NF-κB esta representada en la Figura I.12.

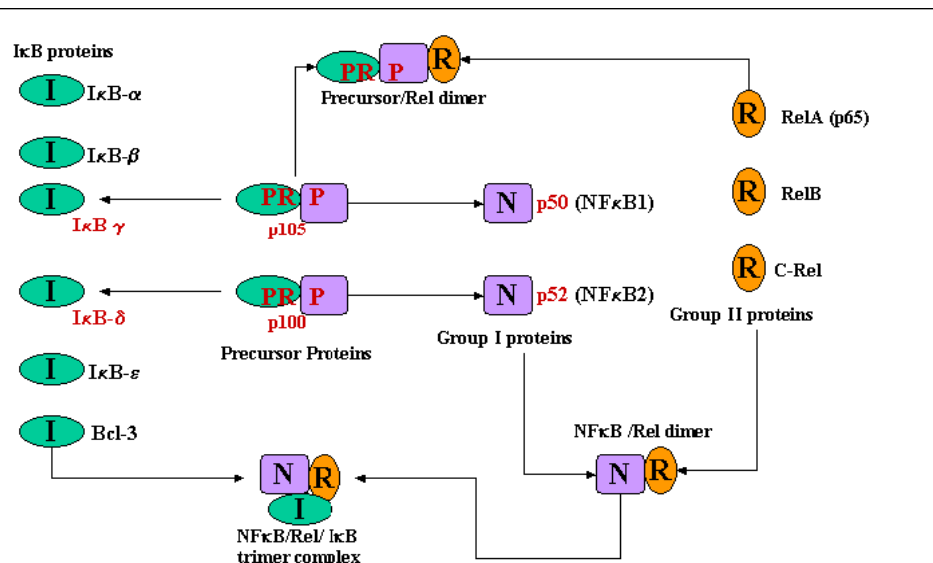


Figura I.12. Generación y dimerización del complejo NF-κB/Rel/ IκB en el citoplasma celular (Baldwin AS Jr-Ann Rev Immunol 1996,14,649

Todas las proteínas NF-κB/Rel contienen conservadas en el segmento N terminal, un dominio de 300 aminoácidos llamado Rel Homology Domain (RHD), Rel Homology Region (RHR) o NRD (NF-κB/Rel/Dorsal). Denominada así porque esta región también se observa en el oncogen Rel y en la proteína dorsal de Drosophila melanogaster. La porción N-terminal de este dominio es responsable

de la capacidad de unión a ADN y la mitad C-terminal es necesaria para la interacción NRD-NRD, es decir, para mantener el heterodímero. El extremo C terminal de esta región también está implicado en la interacción con la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B) y presenta además la secuencia necesaria para que NF- κ B sea llevado al núcleo cuando se produzca su activación, denominada NLS (por "nuclear location sequence") (268) (Figura I.13.).

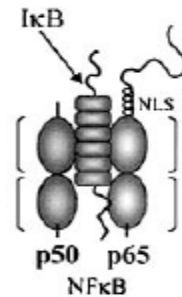


Figura I.13. Interacción de NF- κ B con su proteína inhibidora I κ B

En el dominio C-terminal de la estructura proteica, el NF- κ B presenta una alta variabilidad, responsable de la transactivación. Las proteínas p50 y p52 carecen del dominio C-terminal, por tanto ellas modulan la transcripción compitiendo con otros dímeros NF- κ B para los sitios κ B del DNA (37).

NF- κ B esta presente en citoplasma, en forma inactiva como complejo asociado con el inhibidor proteico kappa B (I κ B). Hasta ahora se han descrito en los vertebrados 7 tipos principales de proteínas I κ B: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , p100/ I κ B- δ , p105/ I κ B- γ , I κ B-R y Bcl-3. El más importante es sin duda I κ B- α por su mayor presencia.

Las distintas moléculas de I κ B tiene una especificidad en unirse e inhibir a varios complejos NF κ B/Rel. Por ejemplo: I κ B gamma, alfa y I κ B beta interacciona con los heterodimeros formados de p50 y p52 con las proteínas RelA o c-Rel, con homo y dimeros de las proteínas RelA y c-Rel.

Todas las proteínas de la familia IκB contienen de 5 a 7 copias estructurales de un motivo estructural de 33 aminoácidos denominado ankirina, el cual es muy importante en la interacción proteína-proteína. La repetición de ésta estructura es responsable del contacto con las proteínas NFκB y tapan la secuencia de localización nuclear (nuclear localization sequence –NLS) situada en la región Cterminal del dominio RHD (Rel homology domain) de las proteínas NFκB.

Como consecuencia NFκB está forzado a quedarse en el citoplasma sin posibilidad de translocarse dentro del núcleo.

Cerca del término N y C, las proteínas IκB contienen una región denominada PEST, dominio rico en residuos de Serina, Prolina, Glutamato, Aspartato, Serina y Treonina. El dominio PEST es el sitio de fosforilación y está implicado en regular la estabilidad de IκB e inhibir la unión del complejo NFκB/Rel con el DNA (probablemente por una vía directa interaccionando con el dominio de fijación κB del DNA)(269). Se ha demostrado que mutaciones en los dominios NLS de NF-κB impiden la unión de éste con IκB, lo que sugiere la existencia de una interacción física en esta misma zona de NF-κB.

Estudios de inmunofluorescencia demuestran la presencia de IκBα tanto en citoplasma como en núcleo, en células HeLa y SCID.

La Figura I.14. indica las principales clases de NF-κB e inhibidores.

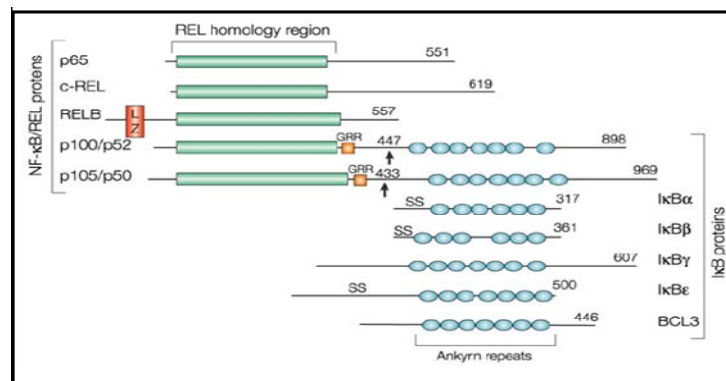


Figura I.14. Clases de genes regulados por NF-κB (*Nat.Rev.Cancer* 2:301-310, 2002)

4.3.- ACTIVACIÓN DEL NF- κ B

En condiciones normales NF- κ B se encuentra como forma inactiva junto a su inhibidor, en el citoplasma. El heterodímero más descrito es el p50/p65 en complejo con I κ B α .

Vías de activación del NF- κ B:

1. Regulación I κ B por vía IKK (I κ B kinasas)
2. Regulación I κ B- α por vía tirosin fosforilación (PI3K)
3. Regulación del potencial transactivador del NF- κ B vía la fosforilación de la subunidad de unión al DNA (PKA)
4. Regulación del NF- κ B por el TNF α
5. Regulación del NF- κ B utilizando un coactivador transcripcional
6. Regulación del NF- κ B vía MAPKinasas
7. Regulación redox del NF- κ B por el oxido nítrico (NO)
8. Otras vías:
 - la proteólisis del precursor proteico p105
 - la fosforilación por la casein kinasa II (CK-II)
 - la fosforilación por la DNA-PK(DNA dependent protein kinase)
 - la fosforilación por RSK

4.3.1.- Agentes inductores NF- κ B

La activación del NF- κ B se realiza bajo la actuación de distintos factores inductores tales como: ERO, citocinas, estrés, estímulos químicos de tipo: forbol ester, agentes quimioterapéuticos, agentes oxidantes y inhibidores de Ser y Thy Fosfatasa, etc. (Figura I.15).

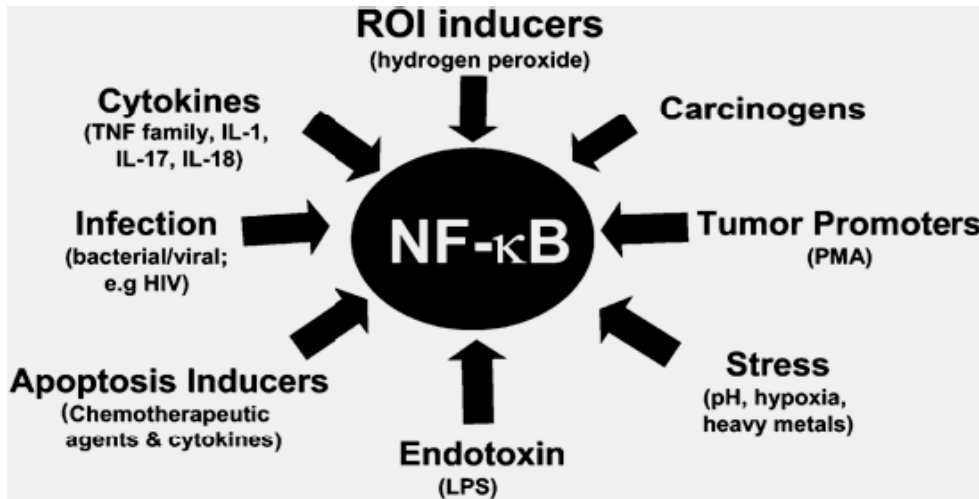


Figura I.15. Agentes inductores NF-κB

NF-κB está descrito como un mediador central en la respuesta inmune y en ciertas respuestas a estrés en humanos. Esta denominación se empieza a entender si miramos el número de agentes inductores y el de genes diana (Tabla I.7.), de este factor transcripcional: hasta el momento se han descrito aproximadamente 150 agentes inductores de NF-κB entre moléculas y ciertos agentes físicos. Por otra parte, se conoce más de 800 genes regulados por NF-κB (Tabla I.8.).

TABLA I.7. SELECCIÓN DE AGENTES INDUCTORES DE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB

BACTERIAS Helicobacter pilory Lactobacilli Micobacteria Tuberculosis	ESTRÉS FISIOLÓGICO Adhesión Hemorragia Hiperoxia Proteinuria Reoxigenación Regeneración hepática	MEDIADORES FISIOLÓGICOS Bradiquinina Leucotrieno B4 PAF	PRODUCTOS VIRALES ARN de doble cadena Adenovirus 5: E1A HIV-1: Nef HIV-1: Tat HBV: HBx	AGENTES AMBIENTALES Humo de tabaco Niquel Manganeseo Hierro Cobalto	RECEPTORES DE LIGANDO Antígeno (IgM-Ligand) CD2-Ligand CD3-Ligand
PRODUCTOS BACTERIANOS Lipopolisacárido Endotoxina estafilocócica Lipoproteínas de membrana	ESTRÉS FÍSICO Ejercicio Radiación Ultravioleta Radiación Gamma	PROTEINAS MODIFICADAS LDL oxidadas Fragmento de Proteína amiloide (bA4) Componente No-beta amiloide de la enfermedad de Alzheimer	CITOQUINAS INFLAMATORIAS CD30 THANK IL-1 TNFα IL-2 TNFβ IL-12 LIF IL-15 IL-18 IL-17	DROGAS DE USO TERAPEÚTICO Tamoxifeno Aloperidol Bleomicina Azidotimidina	MEDIADORES APOPTÓTICOS Anti-Fas/Apo-1 TRAIL
VIRUS Hepatitis B HIV-1 Influenza Virus Rhinovirus Herpes Simplex Virus	ESTRÉS OXIDATIVO Ceruleina Butil Peróxido Ozono Peroxinitrito Pervanadato	SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS eritropoyetina Ig cadena pesada	AGENTES QUÍMICOS Etanol Ácido linoléico Nicotina	MEDIADORES FISIOLÓGICOS Adenosine Albumina Angiotensina II L-Glutamato Heat shock protein 60 Heat shock protein 25	MITÓGENOS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y HORMONAS Insulina Hormona de crecimiento Suero Esteroides

4.3.2. Genes regulados por NF-κB

La mayoría de las proteínas codificadas por NF-κB participan de una manera u otra en la defensa inmune, crecimiento, apoptosis, regulación del metabolismo y sistemas de protección contra diferentes condiciones de estrés (Ver Figura I.16.)

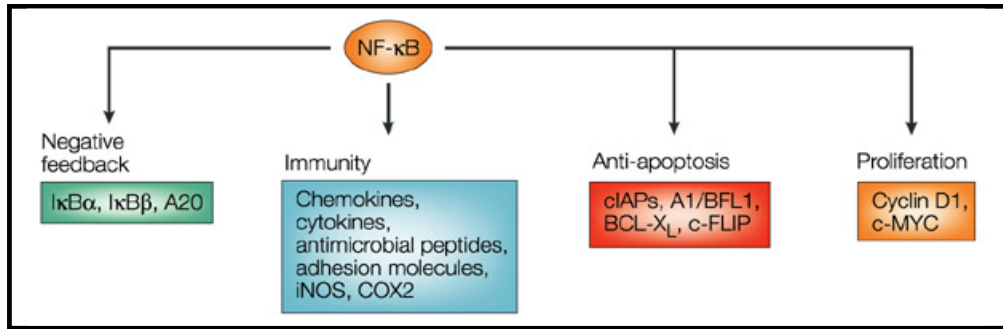


Figura I.16. Familia NF-κB e proteínas inhibidoras κB (IκB) Nature review Cancer

La selección de los genes regulados por NF-κB está ordenada en la siguiente tabla I.8.

TABLA I.8. SELECCIÓN DE GENES REGULADOS POR NF-κB.

GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN	GEN	FUNCIÓN
Citoquinas/Quimiocinas		Inmunoreceptores		Moléculas de adhesión			
CINC-1	Quimiotaxis neutrófilos	BRL-1	IB-cell homing receptor	DC-SIGN	Dendritic cell surface C-type lectin	EPO	Erythropoietin
*CXCL 11	Chemo. ligand para CXCR3	CCR5	Chemokine receptor	ELAM-1 (CD92E, E-selectin)	E-selectin, endothelial cell leukocyte adhesion molecule	*IGFBP-1	Insulin-like growth factor binding protein-1
Eotaxina	Beta Chemo, eosinofil-especifico	CD137	Chemokine receptor	Endoglin	Endothelial cell membrane glycoprotein	IGFBP-2	Insulin-like growth factor binding protein-2
Gro a-g	Melanoma estim actividad	CD154	TNF-like receptor	Fibronectin	Extracellular attachment	M-CSF (CSF-1)	Macrophag Colony Stimulating Factor
IFN-g	Interferon	CD40	CD40 ligand	ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1	NK-1R	Neurorkinin-1 Receptor
IL-1a	Interleu-1a	CD40 ligand	TNF-receptor family member	MadCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule	PDGF B cadena	Platelet-Derived Growth Factor
IL-1b	Interleu-1b	CD48	Ligand for CD40	P-selectin	Platelet adhesion receptor	Proenkephalin	Matrix glycoprotein t
IL-1 receptor antagonist	Inhibitor of IL-1 activity	CD83	Antigen of stimulated lymphocytes	Tenascin-C	ECM protein controls cell attachment and migration, cell growth	*Thrombospondin-2	Vascular Endothelial Growth Factor
IL-2	Interleu-2	CD83	T-cell development	VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule	Factores de transcripcion	
IL-6	Interleu-6, inflam citoq	Fc epsilon receptor II (CD23)	IL-2 receptor subunit			A20	TNF-inducible zinc finger
IL-8	Interleu-8	IL-2 receptor a-chain	IgG heavy chain	Proteínas en fase aguda		c-myc	Proto-oncogene
IL-9	Interleu-9	Immunog Cgamma1	IgG heavy chain	Angiotensinógeno	Precursor del a angiotensina regula presión arterial	c-myc	Proto-oncogene
IL-10	Interleu-10	Immunog gamma4	IgE heavy chain	beta-defensin-2	Péptico Anti-microbial	c-rel	Proto-oncogene
IL-11	Interleu-11	Immunog E heavy chain	Antibody light ch	Proteína de union	Proteína de Unión del Complemento	IRF	Interferon regulatory factor
IL-12 (p40)	Interleu-12	Invariant Chain I ₁		Proteína de Unión C4b	Factor del Complemento	ikB -α	Inhibitor of Rel/ NF-κB
IL-13	Interleu-13	Factores de crecimiento		Factor B Complemento	Activa vías extrínsecas de la vía del complemento	junBMail	Proto-oncogene
IL-15	Interleu-15	G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor	Factor C4Complemento	Pentraxin	nfkB2	NF-κB p100 precursor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor.	GM-CSF	Granulocyte Macrophag		Une al receptor LPS (CD14) con LPS	nfkB1	NF-κB p105 precursor
Virus					Proteínas A amiloides del suero	NURR1	Nuclear orphan receptor
Adenovirus (E3 region)	Adenovirus						
Avian Leucosis Virus	Causa avian leucosis						
Bovine Leucema Virus	Causa bovine leucemia						
CMV	Citomegalovirus						
EBV (Wp promoter)	Epstein-Barr virus						
HBV (pregenomic promoter)	Hepatitis B virus						
HIV-1	Human inmunodeficien virus						
HSV	Herpes simpli virus						
JC Virus	Polioma virus						
HPV type 16	Human Papillomavirus						
SIV	Simian inmunodefeciv virus						
SV-40	Simian virus 40						

GEN	FUNCION	GEN	FUNCION	GEN	FUNCION	GEN	FUNCION
Factor-1 del tejido	Activa vías extrínsecas del complemento	p53	Tumor suppressor	Enzimas		*Egr-1	Mitogen-induced early response gene; zinc finger
Activador plasminógeno tipo Urokinasa	Activa fibrinógeno	relb	Transcription factor Zinc finger	ADH	Liver alcohol dehydrogenase	p22/FRG1	Rat homologue of IEX
Genes de respuesta a estrés		Stat5a	transcription factor	*Ceramide glycosyl transferase	GTPase Glycosphingolipid	*p62	Non-proteasomal multi-ubiquitin chain binding protein
Angiotensin II	Peptide hormone	WT1C	Rat homologue of IEX	*ois-retinoid/androgen dehydrogenase type 1	Short cadena dehydrogenase	*TIEG	TGF- β early response gene; zinc finger protein
CYP2C11	Cytochrome p450	Reguladores apoptosis	Non-proteasomal multi-ubiquitin cadena binding protein	*ois-retinoid/androgen dehydrogenase type 2 (CRAD2)	Short cadena dehydrogenase	Miscelánea	
COX-2	Cyclooxygenase, prostaglandin endoperoxide synthase	Bfl1/A1	Homólogo de Bcl-2	Collagenase 1	Matrix metalloproteinase	alfa-1 acid glycoprotein	Serum protein
Ferritin H cadena	Iron storage protein	Bcl-xL	Pro-survival	*Dihydrodiol dehydrogenase	Oxidoreductase, oxidation of trans-hydrodiols	AMH	Anti-Mullerianhormone
*5-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme, leukotriene synthesis	Bcl-2	Bcl-2 homologue	*ENO2	Enolase 2 gamma	Apolipoprotein C III	Apoprotein of HDL
12-Lipoxygenase	Arachidonic acid metabolic enzyme	Caspase-11	Pro-survival factor	*GAD67	Glutamic acid decarboxylase	*Biglycan	Connective tissue proteoglycan
Inducible NO-Synthase	NO synthesis	Nr13	Caspase	GD3-synthase	Sialyltransferase		
*MAP4K1	Activator of Activator of stress-induc protein kinase pathway	c-FLIP	Pro-survival Bcl-2 homologue	Gelatinase B	Matrix metalloproteinase		
Mn SOD	Superoxide dismutase	CD95 (Fas)	Pro-survival factor	GSTP1-1	Glutathione S-transferase		
NAD(P)H quinone oxidoreductase (DT-diaphorase)	Bioreductive enzyme	*Fas-associated phosphatase-1	Pro-apoptotic receptor	*Glucose- β -phosphate dehydrogenase	Hexose monophosphate		
Phospholipase A2	Fatty acid metabolism	Fas-Ligand	Protein phosphatase	*HO-1	Hemeoxygenase		
Receptores de superficie Celular		IEX-1L	Inducer of apoptosis	Hyaluronan synthase	Synthesizes hyaluronic acid	*Caveolin-1	Lipid raft protein
A1 adenosine receptor	Pleiotropic physiological effects	TRAF-1	Inhibitors of Apoptosis	H+-K+-ATPase alfa2	Role in potassium homeostasis	Cyclin D1	Celul-cycle regulation
Amiloride-sensitive sodium channel	Sodium channel	TRAF-2	Immediate early gene	Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)	Prostaglandin D2 synthase in brain	*Cyclin D3	Celul-cycle regulation
*CD23	Celul-surface molecule		TNF-receptor associated factor	Lysozyme	Hydrolyzes bacterial celular walls	Factor VIII	Hemostasis
CD89	Lectin mainly on activated T	Genes de respuesta temprana	TNF-receptor associated factor	Mmp- θ , matrix metalloproteinase- θ	Secreted gelatinase involved in metastasis	Gadd45beta	ADN repair/celul cycle
		*B94	Early response	iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Galectin 3	b-galactosidase-binding lectin Globin protein
				PIM-1	Ser/Thr kinase	epsilon-Globin	
				*PTGIS,	Prostaglandin synthase	*GS3888	Homology to microtubule aggregating protein
				prostaglandin synthase		HMG14	High mobility group 14
				Serpin 2A	Serine protease	K3 Keratin	Intermediate filament protein
						Laminin B2	Basement membrane
						Cadena	

5. INFLAMACIÓN

5.1.- GENERALIDADES

En los últimos años, la aparición y uso de la biología molecular han ayudado a esclarecer los procesos inmunofisiológicos que intervienen en la homeostasis del hombre. Las interleucinas, una familia de polipéptidos pertenecientes al grupo de mediadores biológicos o citocinas, se han visto beneficiadas con las ventajas de la tecnología recombinante la cual ha permitido conocer la estructura, funciones y mecanismos de regulación de cada una de ellas. Originalmente conocidas como factores protéicos mediadores de la respuesta inmunológica celular, hoy por sus profundos efectos sobre otros sistemas fisiológicos son consideradas las hormonas del sistema inmune.

Las citocinas o interleucinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación inter-celular, son producidas por varios tipos celulares, principalmente por el sistema inmune. Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoiésis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos (270).

5.1.1.- Biología de las citocinas

Más de 100 péptidos genética y estructuralmente diferentes son reconocidos como citocinas. Son muy potentes y actúan uniéndose a receptores específicos sobre la superficie celular. Producidas por diferentes tejidos y tipos celulares.

Las citocinas tienen vida corta actuando a nivel local en forma autocrina y paracrina.

Cada citocina es producida por una sub-población celular en respuesta a diferentes estímulos, induciendo una característica constelación de efectos en cascada agonista, sinérgica o antagónica alterando funcionalmente la célula blanco. Sus actividades son redundantes o sobrepuestas, es decir varias citocinas diferentes comparten o inducen los mismos cambios o acciones biológicas (271).

5.2.- PRINCIPALES CITOCINAS, NOMENCLATURA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA.

Las citocinas se pueden agrupar en 4 grupos funcionales de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúen, así:

1. Citocinas pro-inflamatorias, actúan en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación.
2. Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica.
3. Citocinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o Inmunidad Humoral.
4. Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/o homeostáticas.

1-Citocinas en Inflamación

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inespecífica o inflamación son: Interleukina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), Interleukina 8 (IL-8 y quemoquinas), Interleukina 12 (IL-12), Interleukina 16 (IL-16)

e Interferones, todas ellas son pro-inflamatorias. IL-6 e IL-12, además, actúan en la inmunidad específica, IL-6 es un factor autocrino de linfocitos B7 mientras que IL-12 estimula la inmunidad celular citotóxica (271).

2- Citocinas en Inmunidad Celular

Durante la inflamación los macrófagos y otras células presentan los antígenos a los linfocitos T ayudadores (Th o CD4+) los cuales son muy importantes (si no los principales) moduladores intrínsecos del sistema inmune regulando las dos vías principales de defensa específica: Celular vs Humoral, a través de la secreción de citocinas.

En este instante es relevante mencionar que el perfil o “set” de citocinas secretadas por los linfocitos Th polariza la respuesta inmune hacia una predominantemente citotóxica o celular o hacia el otro extremo predominantemente humoral, esas respuestas son antagónicas o excluyentes entre sí, creando una especie de regulación cruzada muy articular; porque las citocinas que favorecen la inmunidad humoral inhiben las acciones de las citocinas que ayudan a la inmunidad celular y viceversa. Los linfocitos Th que inducen respuesta inmune celular se denominan Th1 mientras que aquellos que favorecen las respuestas humorales son Th2.

Dos son las principales citocinas de Inmunidad Celular o Th1: Interferón gamma (IFN- γ) o tipo 2, llamado también interferón Inmune porque solo es producido por células inmunológicas activadas; la otra citocina es Interleukina 2 o Factor de Crecimiento de Células T (IL-2 o TCGF).

IFN- γ es el principal activador de macrófagos y células citotóxicas T y NK. IFN- γ tiene acción en la inmunidad humoral,

induciendo la producción de IgG. La IL-2 es el factor autocrino de crecimiento de las células T, esencial para mantener viables los cultivos de linfocitos T, también genera células citotóxicas especialmente NK y macrófagos antitumorales).

3- Citocinas de Inmunidad Humoral

La inmunidad humoral se caracteriza por la secreción de anticuerpos por los linfocitos B o células plasmáticas, las cuales son moduladas por las siguientes citocinas: Interleucina 4 o factor estimulante de células B (IL-4 o BCSF), Interleucina 5 (IL-5), Interleukina 6 (IL-6), Interleukina 10 (IL-10) e interleukina 13 (IL-13). Estas linfoquinas son secretadas por linfocitos del tipo Th2, linfocitos B, mastocitos, eosinófilos y algunas por macrófagos (IL-6, IL-13). IL-4 es la más citocina mejor caracterizada en la regulación de la respuesta inmune humoral; en pocas cantidades induce secreción de las subclases de Inmunoglobulina G: IgG1, IgG3 e IgG4; mientras que en excesiva cantidad induce la producción de IgE. Esta citocina antagoniza las acciones biológicas de IFN- γ , tales como la activación de M ϕ y el desarrollo de células citotóxicas, así inhibe las células Th1 (270).

IL-5 es la citocina con rango de acción más reducido al inducir la generación de Inmunoglobulina A (IgA) y Eosinófilos. IL-6 es la mejor estudiada de una familia de citocinas hematopoiéticas (los otros miembros son de muy reciente descubrimiento: Interleukina 11, Factor inhibitorio de leucemias (LIF), Oncostatin M (OSM), Factor neurotrófico ciliar (CNTF) y cardiotrofina. IL-6 es una citocina pleotrófica, en inflamación es la más potente inductora de hepatocitos para la síntesis de reactantes de fase aguda; potencia los efectos de IL-1 y TNF aunque no posee la toxicidad de estas y en la inmunidad

humoral tiene efectos similares a IL-11 promoviendo la diferenciación, proliferación de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas. Adicionalmente, IL-6 es el factor autocrino de crecimiento de células tumorales B malignas y benignas (Mieloma múltiple, Mixoma cardíaco), también está elevada en Lupus Eritematoso Sistémico (autoinmunidad) (270) .

4- Citocinas en Homeóstasis.

Las citocinas actúan en grupos formando secuencias, o cadenas interactivas en procesos tisulares no inmunológicos como la remodelación ósea y en sitios diversos tales como el desarrollo embrionario fetal. Las células progenitoras hematológicas dependen esencialmente del micro-ambiente de la médula ósea finamente regulado por citocinas secretadas principalmente por (células estromales) para controlar su diferenciación y proliferación hacia células sanguíneas maduras, aunque es difícil clasificarlas por su sobreposición funcional, se distinguen tres categorías de citocinas: A- Aquellas que actúan en las células primordiales multipotentes (multilineales como Interleukina 3 (IL-3) y el factor estimulante de monocitos y granulocitos (GM-CSF). B- Las que actúan en líneas celulares ya definidas o comprometidas hacia diferenciación (Restringidas o específicas de líneas definidas tales como Eritropoietina (EPO), eritrocitos, TPO (megacariocitos) G-CSF (granulocitos), M-CSF (monocitos), IL-2 (linfocitos), IL-5 (origina eosinófilos). Las que tienen poco efecto por sí mismas pero que inhiben o hacen sinergia funcional de otras citocinas (stem cell factor)-(SCF), IL-6, IL-1) (270).

II-OBJETIVOS

II-OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en el estudio del papel de la xantina oxidasa en los efectos de la diabetes experimental, con especial atención al proceso inflamatorio asociado a esta enfermedad.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos son:

- 1.** Estudiar el papel que desempeña la xantina oxidasa en el estrés oxidativo asociado a la diabetes experimental inducida con estreptozotocina.
- 2.** Estudiar el papel que juega el alopurinol en la prevención del daño hepático asociado a la diabetes experimental inducida con estreptozotocina.
- 3.** Estudiar el efecto de la administración de alopurinol sobre dos de los criterios diagnósticos de la enfermedad: glucosuria y hemoglobina glicosilada.
- 4.** Estudiar la vía de señalización de NF- κ B en extractos nucleares de hígado de animales diabéticos y el efecto de la administración de alopurinol.
- 5.** Estudiar el papel que juega la xantina oxidasa y el factor de transcripción NF- κ B en el desarrollo de la inflamación en la diabetes experimental.

Estos objetivos son los que fundamentalmente perseguimos en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostramos en los siguientes apartados de la misma.

III-MATERIALES Y MÉTODOS

III-MATERIALES Y MÉTODOS

1-MATERIALES

1.1- SUSTRATO BIOLÓGICO

1.1.1 Ratas.

Para este trabajo se han utilizado ratas Wistar albinas, macho de 3 meses de edad de un peso entre 200-300 g, mantenidas y cuidadas en los laboratorios de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de Valencia. Se mantuvieron en un ciclo lumínico de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. Fueron alimentados “ad libitum” con pienso estándar manufacturado por LETICA (Ref.: IPM-R20), Hospitalet (Barcelona). La composición del pienso es la siguiente:

- Humedad.....13 %.
- Proteínas17 %.
- Grasa bruta 3 %.
- Fibra bruta 5 %.
- Cenizas 5 %.
- M. E. L. N. (Materia energética libre de nitrógeno)....57 %.

La energía metabolizable es de 2.950 Kcal/Kg de pienso. El acceso al agua fue siempre libre.

Las ratas se dividieron en seis grupos experimentales:

A.- Grupo Control 12 días (corto plazo)

B.- Grupo Diabético mantenido 12 días (corto plazo)

C.- Grupo Diabético tratado con Alopurinol y mantenido 12 días (corto plazo)

D.- Grupo Control 28 días (largo plazo)

E.- Grupo Diabético mantenido 28 días (largo plazo)

F.- Grupo Diabético tratado con Alopurinol y mantenido 28 días (largo plazo).

1.2 - APARATOS

• Centrifugas

Para las centrifugaciones a baja velocidad se utilizó una centrífuga de la firma SORVALL, modelo GLC-1.

Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca HERAEUS, modelo Sepatech Biofuge 17RS.

• Espectrofotómetro

Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatizado.

• Autoclave

Marca SELECTA, model Autester-G.

• Agitador magnético

Marca Selecta, modelo Agimatic-S

• pHmetro

El pHmetro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

• Fluorímetro

Marca Perkin Elmer, modelo LS 50B.

- **Balanzas**

Se utilizaron 2 balanzas: una de precisión marca SALTER, modelo HA-120M y una balanza SARTORIUS, modelo PT 1200.

- **Sistema de purificación de agua**

Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.

- **Cubetas de electroforesis**

Marca BIORAD, modelo Mini-PROTEAN 3 Cell

- **Cubetas de electrotransferencia**

Marca BIORAD, modelo Mini Trans-Blot Cell.

- **Fuentes de alimentación para la electroforesis**

Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIORAD, modelo 200/2.0 Power Supply.

- **Sistema de Análisis de Imágenes.**

Marca FUJIFILM, modelo LAS-1000 plus.

- **Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de glutatión**

El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- 2 bombas marca WATERS modelo 510.

- Un inyector PHARMACIA LKB, modelo 2157.

- Detector UV WATERS, modelo 441, a longitud de onda constante de 365 nm.

- Ordenador IBM XT modelo 286 con integrador y que controla el equipo.

- Columna cromatográfica WATERS modelo Spherisorb aminada, de dimensiones 20 X 0.46 cm y 5 µm de diámetro de partícula.

- **Cromatógrafo líquido de alta eficacia para la determinación de MDA.**

El cromatógrafo está compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba marca SHIMADZU modelo LC-10 AD.

- Autoinyector SHIMADZU, modelo SIL-10AD vp.
- Detector UV SHIMADZU, modelo SPD-10 AV.
- Controlador del equipo CBM-10 A.
- Ordenador IBM XT modelo 486 con el programa de integración CLASSLC10.
- Columna TEKNOKROMA de fase reversa, modelo Spherisorb C18 cuyas dimensiones son 15 x 0,46 cm y de un tamaño de partícula de 5 μm .

1.3- REACTIVOS

- **Determinación de proteínas**

Se utilizó el “Bradford Reagent” de la firma BIORAD (Bradford, 1976). Este método depende del cambio en la absorbancia del Azul Comassie G-250 al unirse a proteínas.

- **Revelado de las membranas de Western Blottings.**

Para revelar las membranas de nitrocelulosa de los westerns blottings se empleó el kit “Protoblot Western Blot AP System” de la firma Promega. Está basado en la utilización de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa

- **Enzimas**

Xantina oxidasa (SIGMA).

- **Otros reactivos**

Ácido perclórico 60%, acetato sódico, BPDS, NEM, KOH, CHES, ácido iodoacético, púrpura de m-cresol, FDNB, GSH, GSSG, γ -Glu-Glu, MDA, H₂O₂, fosfato potásico, CDNB, cloruro sódico, EDTA, EGTA, MOPS, HEPES, tris, glicina, acrilamida, bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul comassie, alopurinol, DMSO, estreptozotocina, mercaptoetanol, TEMED, BSA, CSPD, APS, DTT, PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina, metanol, ácido bórico, ácido maleico, Tween

20. Los reactivos se obtuvieron de las firmas: Sigma-Aldrich Química (España), Boehringer Mannheim S.A. (Alemania), Panreac, Merck Biochemica (Alemania).

2.- MÉTODOS.

2.1.- DIABETIZACIÓN DE LAS RATAS.

Para la diabetización de los animales hemos seguido el método descrito por Junod y cols. (272) y modificado por Jain y cols. (273). El método se basa en la destrucción selectiva de los islotes de Langerhans mediante tratamiento con estreptozotocina. La membrana de la célula β -pancreática se daña por el efecto de la estreptozotocina produciendo daños irreversibles en su morfología y permeabilidad (274). Ésta se administró vía intraperitoneal a una dosis de 55 mg. por kilogramo de peso. Como vehículo se utilizó un máximo de 800 microlitros de tampón citrato sódico 0.1 M a pH 4.5.

Al mismo tiempo que se inyectó la estreptozotocina vía intraperitoneal al grupo de animales que se incluyó en el grupo diabético, se inyectó el mismo volumen de tampón de disolución de la estreptozotocina (tampón citrato sódico 0.1 M a pH 4.5) al grupo de ratas control.

A los 5-7 días de la administración de estreptozotocina las ratas presentan una clínica de diabetes, con poliuria, polidipsia y pérdida de peso. Comprobamos este cuadro con parámetros bioquímicos como la medida de la glucosuria, con tiras reactivas múltiples AMES, de la casa BAYER DIAGNOSTICS. Todos los animales que presentaron una glucosuria superior a 2000 mg/dl se incluyeron en el grupo de ratas diabéticas y en el grupo de ratas tratadas con alopurinol.

2.2.- ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL.

El alopurinol se administró vía intraperitoneal en el grupo tratado durante 12 días. Se inyectó una primera dosis (20mg/ Kg en 1ml de DMSO) 30 horas antes del sacrificio y una segunda, 6 horas antes del mismo. La administración de alopurinol en el grupo tratado durante 28 días se realizó en el agua de bebida y a una dosis de 32 mg/kg. La inhibición de la xantina oxidasa plasmática y hepática, se utilizó para comprobar la eficacia de la dosis utilizada.

2.3.- OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

Las ratas se sacrificaron por exsanguinación, recogiendo la sangre directamente de la vena cava. Tras anestesiarse a los animales con pentotal sódico, se practicó una laparotomía media, con material quirúrgico, para la recogida de sangre y la extracción de diversos órganos: hígado, corazón, riñón y aorta. Se procedió al *freeze-clamping*, congelando inmediatamente los órganos extraídos con nitrógeno líquido. Para conseguir la congelación instantánea del órgano completo se han utilizado las tenazas de Wollenberger (275), cuyas mandíbulas de aluminio, de alta conductividad térmica, han sido previamente enfriadas en el nitrógeno líquido. Con ayuda de las tenazas, el órgano queda plano y delgado como una torta fina, facilitando así su rápida congelación. El órgano se mantiene en nitrógeno líquido hasta que se prepara el homogenado del órgano en el medio adecuado en cada caso.

2.4. MÉTODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO BRADFORD

2.4.1. Fundamento:

La unión de las proteínas con el reactivo de Bradford produce un cambio en el color del reactivo, y por tanto un cambio en su absorbancia. El reactivo Bradford contiene ácido fosfórico, metanol y también azul de comassie que al unirse a los residuos aminoacídicos de proteínas y en especial de arginina, cambia su máximo de absorbancia de 465 a 595 nm. (276)

2.4.2.-Reactivos:

Agua Bidestilada

Bradford Reagent (Biorad®)

Homogenado de tejido

BSA (Bovine Seric Albumine): Para realizar la recta patrón

2.4.3.-Procedimiento:

Se realiza una recta patrón de BSA, para posteriormente interpolar nuestras muestras de concentración desconocida.

Se mezclan 800µl de H₂O con 200µl de Bradford. Se lee la absorbancia a 595 nm de cada microcubeta para hacer el blanco. Después se le añade 2 µl de muestra o patrón, según corresponda en cada microcubeta y se lee la absorbancia a 595nm. Ésta debe haber aumentado gracias a la unión del Bradford con las proteínas que contiene la muestra y la recta patrón.

2.4.4.-Cálculos:

Los cálculos consisten en realizar una recta patrón de concentración de proteínas realizada con BSA e interpolar en esa recta los valores de absorbancia obtenidos de nuestras muestras. El valor

que se utiliza para hacer la recta y para calcular la concentración de las muestras es:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}$$

2.5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES A PARTIR DE HÍGADO.

2.5.1. Fundamento:

Para llevar a cabo la valoración de la activación de NF- κ B en hígado mediante la técnica del Western Blotting, es necesaria la obtención de extractos de proteína nuclear.

2.5.2. Protocolo:

1.- Se parte de fragmentos de tejido de hígado de 100 mg., a los que se le añaden 35 mL de Tampón 1 (10mM Hepes pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 5mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1% Triton X-100; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF; 2 μ g/mL Aprotinina; 2 μ g/mL Leupeptina (277).

2.- El tejido se desmenuza minuciosamente y se transfiere a un Falcon de 50 mL donde se homogeneiza.

3.- Se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 g y a 4°C.

4.- El pellet se resuspende en 500-1000 μ L de Tampón 2 (20mM Hepes pH 7.9; 25% Glicerol; 500mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 μ g/mL Aprotinina; 2 μ g/mL Leupeptina)

5- Incubar en hielo la mezcla durante 30 minutos vorteando de forma intermitente la suspensión.

6.- Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g.

7.- Pasar el sobrenadante a una unidad (4mL Ultrafree Filter Unit. Millipore) y añadir un volumen idéntido de Tampón 3 (20mM

Hepes pH 7.9; 10% Glicerol; 40mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 2 µg/mL Aprotinina; 2 µg/mL Leupeptina

8.- Centrifugar durante 60 minutos a 12000g y a 4°C (el volumen normalmente desciende en un 30%)

9.- Añadir 500-1000 µL de Tampón 3 y se centrifuga de nuevo durante 60 minutos a 12000g y a 4°C.

10.- El sobrenadante que contiene extractos proteicos nucleares es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.5.3. Cuantificación

En los extractos nucleares los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (276).

2.6- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS A PARTIR DE HÍGADO.

2.6.1. Fundamento

Para llevar a cabo la valoración de la expresión de p-IKK β , p-I κ B, I κ B, COX2 e iNOS transfiriendo estas proteínas desde geles a membranas (Western Blotting), es necesaria la obtención de extractos de proteínas citoplasmáticas.

2.6.2. Protocolo

1.- Se parte de fragmentos de hígado de entre 100 y 200 mg, que son en primer lugar lavados en PBS.

2.- Tras el lavado se cortan en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1 mL por cada 100 mg de tejido). El tampón consta de: 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7.5; 5 mM EDTA; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfato Sódico 30 mM; 50 mM NaF; 1mM DTT; 1mM PMSF;

3mM Benzamidina; 10 μ M Leupeptina; 10 μ g/mL Aprotinina; 5 μ M Pepstatina A).

3.- El hígado se tranfiere a un homogeneizador tipo Dounce de vidrio (Afora S.A., España) introducido en hielo.

4.- La suspensión se somete a diez pases de homogeneización con el émbolo.

5.- El producto inicial se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12000g a 4°C.

6.- El sobrenadante que contiene extractos proteicos citoplasmáticos es alicuotado y almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización.

2.6.3. Cuantificación.

En los extractos citoplasmáticos los valores de concentración de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (276).

2.7.-DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE GLUTATIÓN TOTAL.

2.7.1.-Fundamento

El glutatión total se determina por H.P.L.C., siguiendo el método descrito por Reed y colaboradores (278). La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La separación se obtiene porque los componentes de la mezcla a estudiar son retenidos de distinta manera por la fase estacionaria.

La cromatografía líquida se basa en el hecho de que durante el desarrollo de un cromatograma la fase móvil arrastra las moléculas de la muestra hacia el lecho estacionario, durante el trayecto las distintas

moléculas de la muestra son retardadas en mayor o menor grado por la fase estacionaria en función de la interacción entre los componentes de la muestra y las fases estacionaria y móvil.

En definitiva, sino existiera interacción las moléculas de un soluto se desplazarían a lo largo de la columna a la misma velocidad que la fase móvil y por lo tanto el tiempo de retención sería bajo, sin embargo, un soluto que interaccione con la fase estacionaria tardará más en salir del lecho estacionario y su tiempo de retención será superior al de la fase móvil.

El método descrito por Reed y colaboradores se basa en la separación de los S-carboximetildinitro derivados por cromatografía y posterior cuantificación a 365 nm. A todas las muestras se les añade una concentración conocida de γ -glutamil glutamato, como patrón interno, el cual nos va a permitir calcular la concentración de la sustancia problema de un modo más exacto.

Con esta técnica cromatográfica, se pueden determinar las concentraciones tanto de GSH como de GSSG de una misma muestra. Sin embargo, el método de Reed y cols., no debe utilizarse para determinar el estatus de glutatión, ya que la muestra sufre una autooxidación del GSH importante en el proceso de derivatización (21). De este modo, parte del GSH se oxida a GSSG dando falsos positivos en los resultados. Sin embargo, sí que es un buen método para la determinación del glutatión total.

2.7.2.- Obtención de las muestras y conservación

Se realiza una extracción sanguínea en la que inmediatamente se pipetea 200 μ L de sangre y se mezclan con 800 μ L de PCA 7.25% BPDS 1.25 mM. A continuación, se centrifuga a 15000g durante 10

minutos a 4° C. De esta manera acidificamos la sangre y conseguimos un sobrenadante ácido, libre de proteínas.

Las muestras pueden ser conservadas a -20° C hasta el momento de su análisis.

2.7.3.- Derivatización de la muestra

1.- Se toman 200 µL de sobrenadante ácido y se le añade 20 µL de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA al 0.3%). Seguidamente añadimos 20 µL de ácido iodoacético 1 M disuelto en púrpura de m-cresol 0.2 mM, que es un indicador de pH que vira a color púrpura entre 8.5 y 9.

2.- La mezcla se lleva a pH 8.5–9 usando un tampón KOH 3 M CHES 0.3M y una vez alcanzado el pH adecuado se incuba la muestra durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

3.- Al finalizar el tiempo de incubación se añaden 400 µL de 1-fluor dinitrobenceno al 1% en etanol absoluto y se mantiene a 4°C y en oscuridad durante 24 horas como mínimo. Llegado a este punto las muestras son estables a 4° C durante varias semanas.

4.- Antes de preparar la dilución que será inyectada en el cromatógrafo, las muestras se centrifugan a 15000g durante 5 minutos a 4° C. De ahí se toman 50 µL de sobrenadante a los que añadimos 270 µL de una mezcla metanol - agua en proporción 800:200.

2.7.4.-Técnica cromatográfica.

Se inyectan 80 µL de la solución que contiene la muestra. La fase móvil está constituida por 2 solventes:

- Eluyente A: es una solución de metanol al 80% en agua bidestilada.

- Eluyente B: es una solución tampón acético/acetato 0.5 M en metanol al 64%.

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elusión de las sustancias que nos interesan se realiza aplicando un gradiente:

- La fase móvil se mantiene durante 5 minutos a un 20% del eluyente B y un 80% del eluyente A.

- Tras este tiempo, comienza a aumentar la cantidad de eluyente B de manera lineal, hasta que a los 15 minutos del cromatograma se alcanza un 99% de B y un 1% de A.

- Se mantienen estas concentraciones de cada solvente de 5 a 10 minutos, dependiendo del tiempo de elución del último compuesto.

- Una vez eluido el último compuesto de interés, se procede al reequilibrado de la columna. Para ello, se alcanzan las condiciones iniciales (20% de B y 80 %de A) manteniéndose así durante 15 minutos.

2.7.5.-Cálculos

Las concentraciones de GSH y GSSG se calculan en el cromatograma basándose en una concentración conocida de patrón interno, que es añadida a cada muestra en el proceso de derivatización. El patrón interno utilizado es γ -glutamil-glutamato, que previamente ha sido calibrado frente a patrones de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Tanto los patrones de GSH como los de GSSG se calibran previamente enzimáticamente, para conocer su concentración exacta. El GSH se calibra por medio de la reacción de la glutatión transferasa y el GSSG por medio de la reacción de la glutatión reductasa.

El glutatión total lo expresamos como equivalentes de GSH, sumándole a la concentración de GSH 2 veces la de GSSG.

$$[\text{GSH}] = \text{Glutation total} - (2 \times \text{GSSG})$$

2.8.-DETERMINACIÓN DEL GLUTATIÓN OXIDADO (GSSG)

2.8.1.- Fundamento

Para la determinación del GSSG se siguió el método cromatográfico descrito por Asensi y colaboradores (21). Se basa en la separación cromatográfica de los dinitrobenceno derivados y posterior detección a 365 nm.

Para que el GSH no sufra una autooxidación en el proceso, se bloquea el grupo tiol con N-etilmaleimida (NEM). Este bloqueo hace que este método sea idóneo para evitar el aumento de concentración de GSSG por oxidación del GSH durante el procesado de la muestra.

2.8.2.-Obtención de las muestras

Tras la extracción sanguínea se pipetea inmediatamente 500 μ L de sangre y se mezclan con 500 μ L de PCA 12% BPDS 2 mM NEM 40 mM. Después de agitar vigorosamente, se centrifuga a 15000g durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante ácido libre de proteínas se usará posteriormente para la determinación del GSSG. Las muestras pueden ser conservadas a -20° C hasta el momento de su análisis.

2.8.3.-Derivatización

1. Se toman 200 μ L de sobrenadante ácido y se mezclan con 20 μ L de patrón interno (γ -glutamil-glutamato 1 mM en PCA 0.3%) y 20 μ L de púrpura de m-cresol 0.2 mM como indicador de pH.

2. Se lleva la muestra a pH 8.5–9 añadiendo KOH 3M CHES 0.3M. El indicador de pH vira a color púrpura cuando lo alcanza.

3. Se centrifuga a 13000g durante 10 minutos a 4°C.
4. Se toman 25 µL de sobrenadante y se mezclan con 50 µL de 1-fluor dinitrobenzeno al 1% en etanol absoluto.
5. Se incuba la muestra 45 minutos en oscuridad y se deseca la disolución a vacío.
6. Las muestras desecadas pueden conservarse durante meses a -20°C hasta el momento de su inyección en el HPLC.
7. Justo antes de la inyección en el cromatógrafo, las muestras se resuspenden en 200 µL del eluyente A.

2.8.4.-Técnica cromatográfica.

Las muestras se procesan en el mismo aparato cromatográfico que el glutatión total (apartado anterior). Las condiciones aplicadas en el ensayo son las mismas, siendo el gradiente de eluyentes, fase estacionaria, fase móvil y detección, idénticas que en el caso anterior.

2.8.5.-Cálculos

El cálculo de la concentración de glutatión oxidado en la muestra biológica, se realiza en función de la calibración de soluciones patrón de concentraciones conocidas de GSSG respecto al patrón interno.

2.9.- DETERMINACIÓN DE LIPOPERÓXIDOS EN FORMA DE MALONDIALDEHÍDO.

2.9.1.- Fundamento.

Se ha seguido el método descrito por Wong y colaboradores (177). Este método se basa en la hidrólisis de los lipoperóxidos presentes en la muestra y posterior formación de un aducto entre el ácido 2-tiobarbitúrico y el malondialdehído liberado (TBA-MDA₂). Puesto que el ácido 2-tiobarbitúrico reacciona con distintos grupos carbonilos presentes en la muestra, además, de con el malondialdehído, se realiza una separación por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa del aducto ácido 2-tiobarbitúrico-malondialdehído del resto de las sustancias reaccionantes presentes en las muestras. Debido a que el malondialdehído proviene de los lipoperóxidos presentes en el medio y, éstos se cuantifican según el aducto TBA-MDA₂, es conveniente hablar de niveles de lipoperóxidos cuantificados como TBA-MDA₂ en lugar de niveles de MDA.

2.9.2.- Procedimiento.

1. A 50 µL de muestra se le añaden 75 µL de H₃PO₄ 0,44 M y 25 µL de la solución de ácido 2-tiobarbitúrico; se agita y se mantiene 60 minutos en un baño a 95 °C.

2. Una vez transcurrido el tiempo se añade 150 µL de la solución neutralizante.

3. Se centrifuga a 10000 g durante 5 minutos a 4 °C y se inyectan 50 µL del sobrenadante obtenido en el H.P.L.C.

Debe tenerse en cuenta que el aducto ácido 2-tiobarbitúricomalondialdehído es estable a pH neutro-básico un máximo de 20 minutos, por lo que se debe operar con rapidez.

2.9.3.-Técnica cromatográfica

Todo el proceso se realiza a un flujo constante de 1 ml/minuto. La elusión del aducto TBA-MDA₂ se realiza en condiciones isocráticas, siendo la fase móvil una mezcla de KH₂PO₄ 50 mM pH=6,8 y acetonitrilo (70:30). El tiempo de retención del aducto TBA-MDA₂ es aproximadamente de 5 minutos, y el tiempo del cromatograma fue de 10 minutos.

La detección del aducto TBA-MDA₂ se realizó con un detector ultravioleta visible a una longitud de onda de 532 nm.

2.9.4.-Cálculos.

El área del pico correspondiente al aducto TBA-MDA₂ se valora frente a una recta patrón construida con MDA-bis. En la construcción de la recta patrón debe incluirse un blanco. La recta patrón se hace a partir de las siguientes soluciones de MDA-bis: blanco; 0,6 µM; 1,5 µM; 6,0 µM; 15 µM y 60 µM.

2.10.- DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA

2.10.1.- Fundamento.

Para la determinación de hemoglobina en los hemolisados hemos utilizado el método de Drabkin y Austin (279), el cual se basa en la conversión de la hemoglobina en cianmetahemoglobina y posterior determinación a 540 nm.

2.10.2.- Reactivos.

Para esta determinación hemos utilizado un KIT comercializado por SIGMA (referencia 5253), el cual está formado por los siguientes reactivos:

- Reactivo de Drabkin (bicarbonato sódico 100 partes; ferricianida potásica 20 partes; cianida potásica 5 partes).
- Solución BRIJ-35
- Patrón de hemoglobina.

La solución de trabajo se prepara reconstituyendo el reactivo de Drabkin con 1000 ml de agua bidestilada. A esta solución se le añade 0.5 ml de la solución BRIJ-35. Este compuesto evita la formación de turbidez.

Las soluciones de calibración se preparan disolviendo el patrón de hemoglobina en la solución de trabajo. Las concentraciones de las soluciones de calibración en mg/ml fueron de 0,717; 0,645; 0,574; 0,502; 0,430; 0,359; 0,287; 0,215; 0,143 y 0,072.

2.10.3.- Preparación de la muestra biológica.

Obtener unos 2 ml de sangre con jeringa heparinizada. Colocarla en un tubo heparinizado. Centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Eliminar el plasma por aspiración. Lavar tres veces los eritrocitos con suero fisiológico. Para un sedimento de 1 ml de eritrocitos añadir 4 ml de agua bidestilada fría. Agitar vigorosamente en el vórtex e incubar durante unas 2 horas a 4°C para lisar los eritrocitos. Este hemolisado es el que se utilizará para la determinación de la hemoglobina.

2.10.4.- Procedimiento.

Se prepara una batería de tubos con 2 ml de la solución de trabajo. A cada tubo se le añade 20 µl del hemolisado y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se determina la variación de absorbancia a 550 nm respecto al blanco.

2.10.5.- Cálculos.

Para calcular la cantidad de hemoglobina se extrapola en la recta de calibración calculada para cada batería de determinaciones.

2.11.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE XANTINA OXIDASA / XANTINA DESHIDROGENASA

2.11.1.- Fundamento

Se sigue un método fluorimétrico descrito por Beckman y cols. (280). Este método está basado en la monitorización fluorimétrica de la formación de isoxantopterina a partir de pterina, reacción catalizada tanto por la forma oxidasa como por la forma deshidrogenasa. Si en el medio de reacción no hay azul de metileno (un aceptor de electrones), estaremos determinando la forma oxidasa, la cual utiliza al O₂ como aceptor de electrones. Si al medio de reacción le añadimos azul de metileno, la variación de fluorescencia se deberá tanto a la forma oxidasa como a la forma deshidrogenasa. La formación de isoxantopterina se sigue fluorimétricamente a 345 nm de excitación y 390 nm de emisión.

2.11.2.- Reactivos

- Tampón fosfato potásico 50 mM EDTA 0.1 mM, pH 7.4
- Pterina (2-amino-4-hidroxipteridina) 1 mM.

Se pesan exactamente entre 3 y 4 mg de pterina y se resuspenden inicialmente en 100 μ l de NaOH 1M. Una vez disuelta, se le añade el agua necesaria para alcanzar una concentración 1 mM.

Esta solución es estable durante 1 o 2 días a temperatura ambiente.

- Isoxantopterina 1 mM.

Se prepara una solución acuosa de isoxantopterina 1 mM. A partir de esta solución se diluye a una concentración 10 μ M con tampón fosfato. La concentración exacta de la solución 10 μ M de isoxantopterina se determina espectrométricamente a 336 nm ($\epsilon_{336} = 13.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Esta es la solución estándar.

Esta solución se ha de preparar y valorar diariamente.

- Azul de metileno 1 mM en agua.

Esta solución se puede conservar congelada.

- Alopurinol 1 mM en agua.

Para conseguir una perfecta disolución se ha de preparar en agitación y calentándose. Una vez disuelta se separan alícuotas que se pueden conservar congeladas.

2.11.3.- Preparación de la muestra biológica.

a.- Plasma: La determinación de la actividad xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa se realizó en plasma. Este se obtuvo por centrifugación a 1300g de la sangre heparinizada recién extraída. Una vez obtenido el plasma se puede conservar a -20 °C durante varios meses. La determinación de la actividad XO/XDH en plasma de rata, se hace directamente del plasma extraído como se explica anteriormente, sin embargo en humanos la concentración plasmática de ácido úrico es lo suficientemente importante como para inhibir la determinación de estas enzimas. Así pues para determinar XO/XDH en plasma humano tenemos que purificar las muestras mediante columnas de sephadex G-25, equilibradas con tampón fosfato, y realizar la determinación en el eluato.

b.- Hígado: El hígado recién extraído se homogeneiza en frío con tampón fosfato 50mM, EDTA 0.1mM: Sacarosa 0.5 M, DTT 10mM, PMSF 1mM. Se centrifuga a 15000 g durante 30 minutos y a 4°C. El sobrenadante se utilizará para determinar la actividad de la xantina oxidasa y deshidrogenasa.

2.11.4.- Procedimiento

Todo el proceso se realiza con el fluorímetro termostaticado a 37°C.

1.- Añadir en una cubeta la muestra y tampón fosfato hasta completar un volumen final de 2 ml.

Para muestras de plasma con 25 μ l de muestra es suficiente, para muestras de hígado se pondrán 20 μ l.

2.- Se sigue la emisión de fluorescencia a 345 nm de excitación y 390nm de emisión durante un minuto. Es la línea de base o blanco.

3.- Se añaden 20 μ l de la solución de pterina 1 mM y se sigue la emisión de fluorescencia durante dos minutos. Esta pendiente nos indica la actividad xantina oxidasa.

4.- Se añaden 20 μ l de la solución de azul de metileno y se sigue la emisión de fluorescencia durante dos minutos. Esta pendiente nos indica el conjunto de la actividad xantina oxidasa y deshidrogenasa, ya que el azul de metileno actúa como aceptor de electrones de la forma deshidrogenasa.

5.- Se añaden 20 μ l de la solución de alopurinol y se sigue la emisión de fluorescencia durante 1 minuto. No debe variar la fluorescencia, pues el alopurinol inhibe tanto la xantina oxidasa como la deshidrogenasa.

6.- Se realiza una medida puntual que es la que se utilizará como blanco para la calibración de la isoxantopterina.

7.- Se añaden 20 μ l de isoxantopterina 10 μ M

8.- Se realiza otra medida puntual. Obtendremos el incremento de fluorescencia debido a la isoxantopterina. Es un patrón interno.

2.11.5.- Cálculo de la actividad

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μ mol de isoxantopterina por minuto. En plasma la expresamos en unidades por litro de plasma, en hígado en unidades por mg de proteína.

A.- Para el cálculo de la actividad xantina oxidasa:

$$U=(\Delta F/\text{min})*(([\text{Isoxan}]*0.02)/(2.08*1000*\text{Fisoxan}))* (2.02/0.025)$$

donde:

$\Delta F/\text{min}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir la pterina.

[Isoxan] es la concentración de isoxantopterina expresada en μM y calculada en el espectro.

Fisoxan es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la concentración calibrada de isoxantopterina.

B.- Para el cálculo de la actividad xantina oxidasa y deshidrogenasa:

$$U=(\Delta F/\text{min})*(([\text{Isoxan}]*0.02)/(2.08*1000*\text{Fisoxan}))* (2.04/0.025)$$

donde:

$\Delta F/\text{min}$ es la variación de fluorescencia observada por minuto tras añadir la solución de azul de metileno.

[Isoxan] es la concentración de isoxantopterina expresada en μM y calculada en el espectro.

Fisoxan es el incremento inmediato de fluorescencia que se produce tras añadir la concentración calibrada de isoxantopterina.

2.12. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE I κ B- α , NF- κ B, FOSFORILACIÓN DE I κ B- α , IKK β Y DE LA FOSFORILACIÓN DE INOS Y COX2 MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (PAGE-SDS) Y POSTERIOR WESTERN BLOTTING.

2.12.1. Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza mayoritariamente para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE en condiciones desnaturizantes. En presencia de algunos compuestos químicos las proteínas pierden su estructura nativa. Tales compuestos, agentes desnaturizantes, producen el desplegamiento de la proteína que aparece así sin la organización tridimensional característica de su función biológica. La combinación de un detergente desnaturizante (SDS) y un agente reductor (β -mercaptoetanol) es la que se utilizó.

Los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular y, así, es posible estimar su peso molecular. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO₄⁻), los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme. La separación, por tanto, depende de un parámetro físico-químico, el peso molecular, que se puede calcular.

Todas ellas se valoraron utilizando como referencia los niveles de tubulina en los extractos citosólicos.

2.12.2. Condiciones del gel y transferencia.

Para detectar el estado de fosforilación de estas proteínas se cargaron 50 μ g de proteína citoplasmática en geles discontinuos al

12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 300 mAmpérios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

En el caso de los estudios para detectar la expresión y fosforilación de I κ B- α e IKK β se cargaron 40 μ g de proteína citoplasmática.

2.12.3. Visualización.

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

3.- Las membranas se incuban durante toda la noche a 4°C con agitación orbital en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios (Cell Signaling Technology y Santa Cruz) (Ver Tabla III. 1)

4.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

5.-Las membranas son incubadas 60 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-IgG de conejo

preparado en burro, (Cell Signaling Technology). El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (1:2000).

6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT).

TABLA III.1.: DESCRIPCIÓN DE LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA WESTERN BLOTTING.

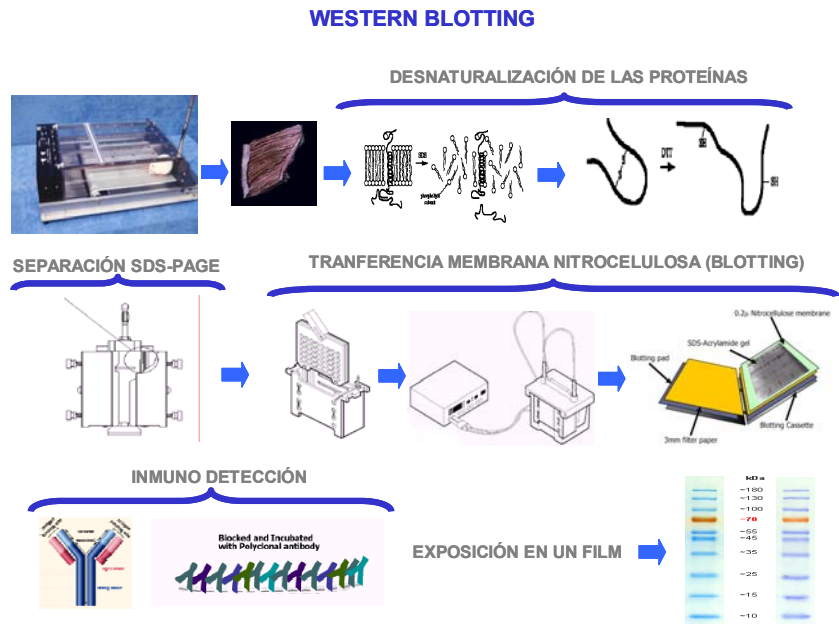
Anticuerpo	Descripción	Peso M	Fuente	Dilución
Anti $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$	Detecta los niveles totales de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$	41 kD	Conejo	1:500
Anti $\text{p-I}\kappa\text{B-}\alpha$	Detecta los niveles de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ fosforilada	~41 kD	Conejo	1:1000
Anti $\text{p-IKK}\beta$	Detecta los niveles de IKK β fosforilada en Ser182	~87 kD	Conejo	1:500
Anti NFκB (p65)	Detecta los niveles totales de NF κ B en el núcleo	65 KD	Ratón	1:750
Anti Cox-2	Detecta los niveles totales de Cox-2	80 kD	Conejo	1:500
Anti iNOS	Detecta los niveles totales de iNOS	130 KD	Conejo	1:2000
Anti α-tubulina	Detecta los niveles de la isoforma α -tubulina	55KD	Ratón	1:750

2.12.4. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escanadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software “Analysis 3”.

Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función de los valores de expresión de tubulina en los extractos citosólicos de hígado.

FIGURA III. 1: ESQUEMA DE LA TÉCNICA DEL WESTERN BLOTTING.



2.13. ESTUDIO DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS DE HÍGADO.

2.13.1. Fundamento

Las modificaciones oxidativas de las proteínas por acción de los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno como el hidroxinonal ocurren tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Como consecuencia de las modificaciones, los grupos carbonilo son introducidos en el interior de las cadenas de aminoácidos de forma específica.

Los grupos carbonilo son derivatizados a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Las muestra derivatizadas son separadas mediante electroforesis en gel de acrilamida seguida por un Western Blotting y la inmunodetección.

2.13.2. Preparado del lisado proteico.

1.- Se parte de fragmentos de hígado de 100 mg, que son en primer lugar lavados en PBS.

2.- Tras el lavado se cortan en pequeños trozos en tampón de lisis frío (1 mL por cada 100 mg de tejido). El tampón consta de: 50 mM NaCl; Tris 10 mM pH 7.5; 5 mM EDTA; Sucrosa 0,25 M; Pirofosfato Sódico 30 mM; Ortovanadato Sódico 100 μ M; 50 mM NaF; 50mM DTT; 1mM PMSF; 3mM Benzamidina; 10 \square M Leupeptina; 10 μ g/mL Aprotinina; 5 \square M Pepstatina A).

3.- El músculo se transfiere a un homogeneizador tipo Dounce de vidrio (Afora S.A., España) introducido en hielo.

4.- La suspensión se somete a diez pases de homogeneización con el émbolo.

5- El producto inicial se pasa a tubos de microcentrífuga y se centrifuga durante 15 minutos a 12000g y a 4°C.

6.- El sobrenadante es almacenado a -80°C hasta su valoración y utilización

2.13.3. Derivatización de la muestra

Para la derivatización de la muestra se utilizaron los reactivos presentes en el kit (Oxyblot Protein Oxidation Kit, Intergen Company) así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

1.- Se parte de entre 15-20 µg de proteínas que son desnaturalizadas con SDS 12% para alcanzar una concentración final de SDS 6%.

2.- La muestra se derivatiza añadiéndole una solución 1xDNPH. El volumen añadido es idéntico al que suman la proteína con el SDS.

3.- Los tubos se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4.- La muestra se neutraliza con la Solución de Neutralización del Kit.

2.13.4. Condiciones del gel y transferencia.

Una vez neutralizadas las muestras están preparadas para cargar en el gel de poliacrilamida. Para valorarla oxidación de proteínas en músculo esquelético se cargaron 20 µg en geles discontinuos al 12% de Acrilamida (29:1 Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de

voltaje constante de 100 Voltios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3). Una vez finalizado el desplazamiento electroforético el gel es transferido (Western Blotting) a una membrana de Nitrocelulosa (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se desarrolla durante 2 horas, a una temperatura de 4°C, una intensidad constante de 300 mAmpierios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

2.13.5. Visualización.

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 5% p/v de leche desnatada en polvo, 0,1% Tween-20 en 1XTBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

3.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital, en tampón de anticuerpo (5% BSA, 0,1 % Tween-20 en 1XTBS) y con una dilución 1:150 de anticuerpo primario (Anti-DNP de conejo)

4.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

5.- Las membranas se incuban 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación orbital , en tampón de bloqueo y con una dilución 1:300 de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti IgG de conejo preparado en cabra.

6.- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 15 mL de TBS-T.

7.- La membrana se incuba 1 minuto con reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) e inmediatamente se expone a autorradiografía con films de fotografía (KODAK X-OMAT)

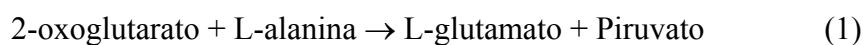
2.13.6. Cuantificación de los resultados.

Las imágenes obtenidas fueron escanadas y mediante el programa PrestoPage manager para EPSON, almacenadas en formato digital TIF para poder ser densitometradas utilizando el software “Analysis 3”.

2.14.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALANINO AMINO TRANSFERASA EN PLASMA (ALT).

El grado de necrosis hepática lo evaluamos mediante la determinación de la actividad en plasma de la enzima alanina amino transferasa (ALT) mediante la utilización de un KIT comercial (Sentinel Diagnostic, Milano, Italia).

Las muestras de sangre se centrifugaron a 1300g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma obtenido lo utilizamos para la determinación de la actividad de la ALT, que se basa en las siguientes reacciones enzimáticas (1 y 2):



La alanina amino transferasa cataliza la transferencia de un grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato para formar glutamato y piruvato. El piruvato es posteriormente reducido a lactato en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa, con la oxidación simultánea de NADH.

La cantidad de NADH consumido (absorbancia a 340 nm) es directamente proporcional a la actividad de la ALT. Los resultados los expresamos en U/L.

2.15.- EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA NECROSIS HEPÁTICA.

Para los estudios morfológicos hemos utilizados fragmentos de hígado de dimensiones aproximada de: 1 x 0,5 x 0,3 cm. Los fragmentos fueron fijados en una solución de formaldehído al 4% en 50 mM de tampón fosfato durante 18 horas a 4°C y posteriormente incluidos en parafina.

Secciones de aproximadamente 5 μ m de espesor fueron teñidas con hematoxilina-eosina. La necrosis fue evaluada de forma semi-cuantitativa en diez muestras biológicas (x250) no consecutivas y valoradas de la siguiente forma: 0: ausencia de necrosis, 1: necrosis en manchas (hepatocitos necróticos aislados), 2: necrosis en focos (necrosis presente a nivel periportal, perivenular o medioacinar), 3: necrosis de varios focos (necrosis presente en más zonas acinares), 4: necrosis consistente: necrosis de unión entre estructuras vasculares afluyentes hacia el órgano y efluyentes desde el mismo. Los criterios morfológicos utilizados para la determinación de la necrosis fueron: aumento de la eosinoflia citoplasmática, vacuolización, disrupción celular, ruptura de la arquitectura celular y modificaciones nucleares tales como picnosis, cariólisis y carioresis. La valoración de la necrosis en los distintos grupos experimentales se expresó como valor medio \pm error típico.

2.16.- EVALUACIÓN HISTOQUÍMICA DEL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS

El número de neutrófilos se evaluó en tejido incluido en parafina, utilizando como reactivo el naftol AS-D cloroacetato, sustrato que permite evidenciar la actividad “in situ” de la enzima esterasis no-específica presente en los neutrófilos. La técnica utilizada sigue el método descrito por Maloney et al con pequeñas modificaciones. El sustrato fue disuelto en dimetil sulfóxido/Triton X-100 (9:1 v/v), al cual se agregó un 0,1% de Fast Garnet GBC disuelto en tampón fosfato 0,1 M, pH 8,5. Los PMN teñidos de rojo intenso fueron contados en 20 campos histológicos no consecutivos (magnificación 400x), elegidos al azar. Los resultados se expresan como media \pm error típico del número de PMN por muestra histológica.

2.17.- EVALUACIÓN DE GRO/CINC-1, IL-6, IL-1 β POR ELISA

Los niveles de GRO/CINC-1, IL-6, IL-1 β en plasma y en hígado se midieron utilizando un kit inmunoenzimático. El kit prevé la utilización de dos parejas de anticuerpos específicos conjugados (Anti-Rat GRO/CINC-1, IL-6 o IL-1 β Rabbit IgG e HRP conjugate Anti Rat GRO/CINC-1, IL-6 o IL-1 β Rabbit IgG Fab) y utiliza como reactivo un agente cromógeno, la tetra-metil-benzidina. La reacción se bloqueó con H₂SO₄ 1 N y la variación de color se evaluó por espectrofotometría en un lector automático de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de las interleucinas medidas presente en la muestra.

2.18.- EXTRACCIÓN DE OXISTEROLES Y ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Para el análisis del contenido de oxisteroles se utilizaron muestras de hígado congeladas a -80°C tras sacrificio de los animales a los 12 y 28 días. El tejido se homogenizó en tampón PBS 1x. En las mismas muestras se midió la concentración proteica con el método de Peterson (1979).

A cada muestra se agregaron 100 µL de 5α-colestano (solución madre de 5 mg/mL de tolueno) como patrón interno y se procedió a la extracción de lípidos con el método de Folch (1957) utilizando una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 (v/v) que lleva un 0,001% de BHT.

3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.

Todos los resultados presentados en la presente tesis se expresan como valores de la media \pm desviación estándar, indicando el número de observaciones (n) entre paréntesis. El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, cuando se compararon grupos controles, diabéticos y diabéticos tratados con alopurinol, se realizó tras averiguar la normalidad de distribución de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Visto que en varios casos los grupos de datos no seguían una distribución normal, se compararon las medias de los grupos con una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis. Se consideró como hipótesis nula la falta de diferencia entre las medias de los grupos y se rechazó la hipótesis nula para valores de α inferiores a 0,05. Al alcanzar la significatividad estadística se efectuaron contrastes *a posteriori* con la prueba U de Mann-Witney y se aceptaron como significativas las comparaciones con valores de $p < 0,05$. Todo el tratamiento estadístico de los resultados se realizó con el software SPSS versión 13 para Windows.

IV-RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1.- MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS EN DOS MODELOS, DE DISTINTA DURACIÓN, DE DIABETES EXPERIMENTAL EN ANIMALES.

1.1.-PARÁMETROS URINARIOS: GLUCOSURIA.

Para la realización de la presente tesis doctoral, dos grupos de animales fueron diabetizados mediante la inyección intraperitoneal de estreptozotocina (ver apartado de Materiales y Métodos). El diagnóstico de la enfermedad estuvo basado, principalmente, en la presencia de elevados niveles de glucosa en orina. Se incluyó en el grupo diabético a los animales con una glucosuria superior a 2000 mg/dL. Para la determinación de los valores de glucosa en orina en los animales se utilizaron tiras reactivas múltiples AMES, de la casa BAYER DIAGNOSTICS. Una vez seleccionados los animales fueron distribuidos, de forma aleatoria, en dos grupos experimentales cuya única diferencia fue el tiempo que fueron mantenidos con la enfermedad: grupo diabético 12 días y grupo diabético 28 días. Como se puede observar en la tabla IV.1, existe un aumento evidente de la glucosuria ($p < 0.01$) en los grupos diabético y diabético tratado con alopurinol, tanto respecto al grupo control a los 12 días como frente al grupo control transcurridas 4 semanas de la inyección del fármaco. El alopurinol se administró, en todos los casos, mediante inyección intraperitoneal de dos dosis de 32 mg/Kg de peso, en las 30 y 6 horas previas al sacrificio de los animales.

TABLA IV.1: CON CENTRACIÓN DE GLUCOSA EN ORINA.

Grupo	12 días	28 días
	mg/dL	mg/dL
Control (7)	Negativo (<100)	Negativo (<100)
Diabética (7)	> 2000 **	> 2000 **
Diabética + Alopurinol (7)	> 2000 **	> 2000 **

Tabla IV.1.: Concentración de glucosa en orina en ratas control y diabetizadas mediante la inyección de estreptozotocina. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney

** $p < 0.01$ vs control.

1.2. - PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.

En este apartado de los resultados, nos planteamos el estudio del efecto que la administración de alopurinol podría tener sobre un marcador de daño hepático en los dos grupos experimentales planteados en la presente tesis.

1.2.1. – Valores de alanina aminotransferasa (ALT) en plasma de rata.

Determinamos la actividad de la enzima ALT, como marcador de daño hepático, en muestras de plasma de animales diabetizados mediante la inyección de estreptozotocina. Esta enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético, principalmente. Los valores plasmáticos normales en animales para ALT son 5-40 U/l.

Los resultados de las Figuras IV.1 muestran un aumento significativo en la actividad ALT en plasma de los animales diabéticos. La administración de alopurinol significativamente previene ese incremento aunque no revierte los valores de ALT a rangos similares al grupo reposo.

FIGURA IV.1: VALORES DE ALANINA AMINOTRANSFERASA EN PLASMA DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

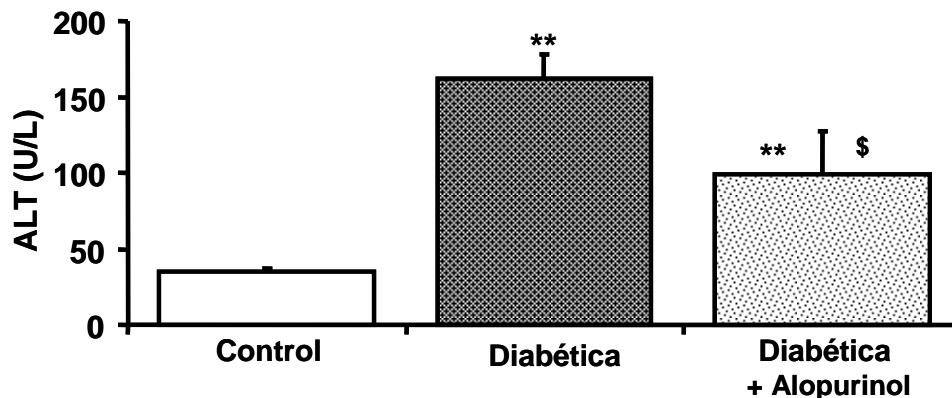


Figura VI.1.: Efecto de la administración de alopurinol sobre la actividad ALT en plasma de ratas diabéticas (modelo corto plazo). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. **, $p < 0,01$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

1.2.2.- Valores de hemoglobina glicosilada.

La determinación de la glucohemoglobina es el método habitual de evaluación del control glucémico. Cuando la glucosa plasmática está sistemáticamente elevada, aumenta la glucosilación no enzimática de la hemoglobina; esta alteración refleja la historia de la glucemia en los 2 ó 3 meses previos. Si se mide por HPLC, la HbA1c se aproxima a los siguientes valores medios de glucosa plasmática: HbA1c del 6% corresponde a 120 mg/dL; 7% a 150 mg/dL, 8% a 180

mg/dL, etc. Los resultados de la figura IV.2 no muestran ningún aumento significativo en los valores de HbA1c en el modelo de diabetes a corto plazo. Del mismo modo la administración de alopurinol a los animales diabéticos tampoco muestra ningún efecto sobre este parámetro.

FIGURA IV.2: VALORES DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA EN PLASMA DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

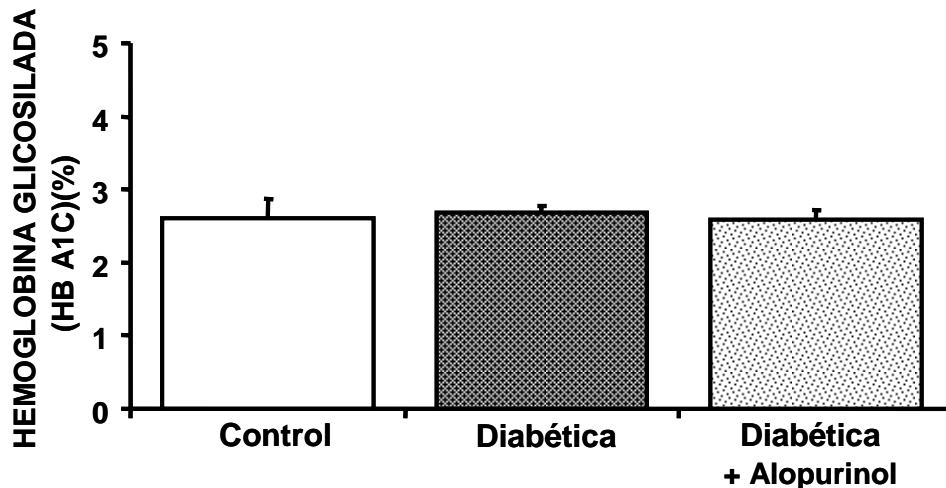


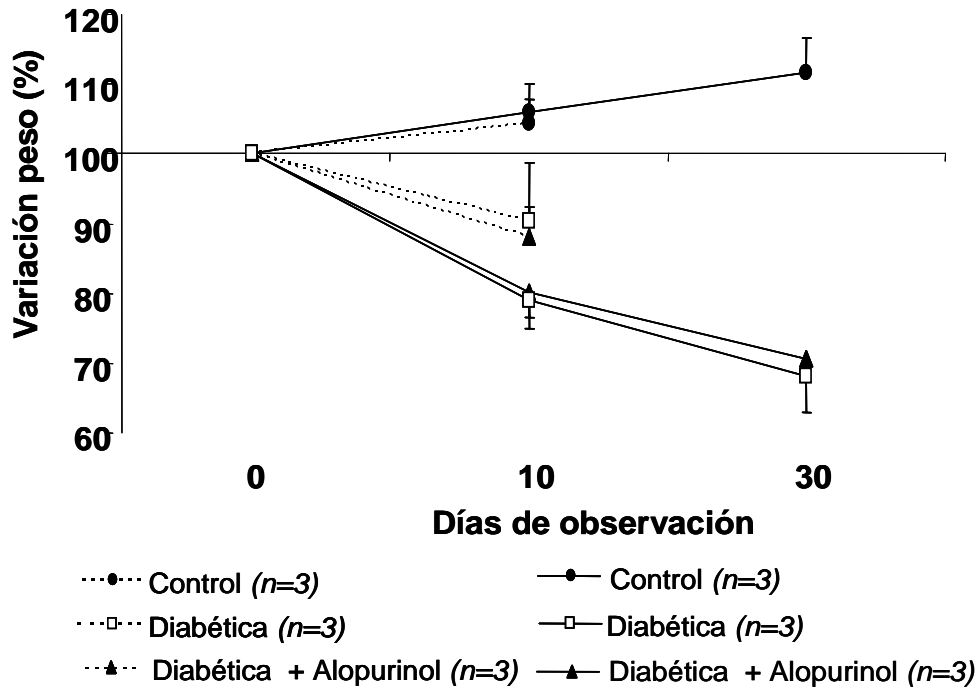
Figura IV.2.: Porcentaje de hemoglobina glicosilada en plasma de ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4).

1.3.- EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES.

El adelgazamiento fue el signo más evidente de la descompensación metabólica. La evolución de los pesos de los animales puede verse en la figura IV.3 donde se observa una disminución de ganancia de peso corporal en los animales diabéticos, y diabéticos tratados con alopurinol. Los valores muestran una

diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos experimentales: corto plazo (12 días) y largo plazo (28 días).

FIGURA IV.3: EVOLUCIÓN DE LOS PESOS EN LOS ANIMALES.



Grupo	12 días	28 días
Control	4,6 ± 4,2 (%)	11,62 ± 4,92 (%)
Diabética	- 9,66 ± 10,32 (%) **	-31,84 ± 5,23 (%)**
Diabética + Alopurinol	- 12,11 ± 7,21 (%) **	-29,29 ± 4,65 (%) **

Figura IV.3.: Porcentaje de variación del peso en dos grupos de animales diabéticos y diabéticos tratados con alopurinol. Los valores se expresan como media ± desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. ** p< 0.01 vs control.

1.4. – PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.

1.4.1.- Determinación de la necrosis hepática. Tinción de hematoxilina-eosina.

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. El hígado proveniente de los animales control estaba constituido por cordones de hepatocitos armónicamente distribuidos entre las vías vasculares de ingreso (espacio portal) y de salida (vénula hepática terminal) (figura IV.4 a y d). Los hígados de los animales con diabetes, inducida con el tratamiento con estreptozotocina durante 12 días, presentaban evidentes signos de daño consistentes en extensas áreas necróticas (figura IV.4 b y e). Sin embargo, estas alteraciones disminuyen visiblemente en el grupo experimental tratado con alopurinol. (figura IV.4 c y f).

FIGURA IV.4: DETERMINACIÓN DE LA NECROSIS HEPÁTICA EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

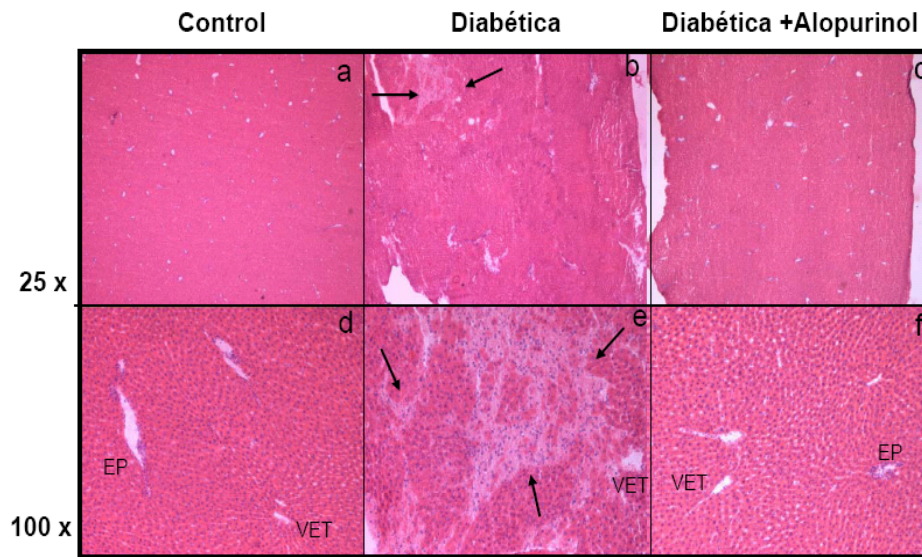


Figura IV.4. Determinación de necrosis hepática en ratas diabéticas de 12 días . La figura muestra la imagen de un experimento representativo Durante la diabetes inducida con estreptozotocina (55 mg/kg p.c.) se observó un incremento de la necrosis en hígado, que se revierte con el tratamiento con alopurinol (dos dosis suministradas 30h y 6 h antes del sacrificio) (20 mg/kg p.c.).

Leyenda: VET: vena hepática terminal; EP: espacio portal; FLECHA: necrosis hepatocelular
 a: control x25; b: diabética x 25; c: Diabética+Alopurinol x25;
 d: control x100; e: diabética x 100; f: Diabética+Alopurinol x100;

1.4.2 - Determinación de la infiltración de neutrófilos a nivel hepático.

La entidad de la respuesta inflamatoria se ha evaluado en términos de número de neutrófilos (PMN) por campo histológico. Como se observa en la figura IV.5, en las ratas diabéticas durante 12 días, observamos un aumento de un 442% en la infiltración, respecto al grupo control. En estas condiciones la administración de alopurinol disminuye de forma significativa la infiltración neutrofilica.

En el caso del modelo a largo plazo, figura IV.6, el número de PMN aumenta en un 446% en el grupo de ratas diabéticas respecto a los animales control. Sin embargo la administración de alopurinol no modifica de forma significativa este parámetro inflamatorio.

FIGURA IV.5: DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

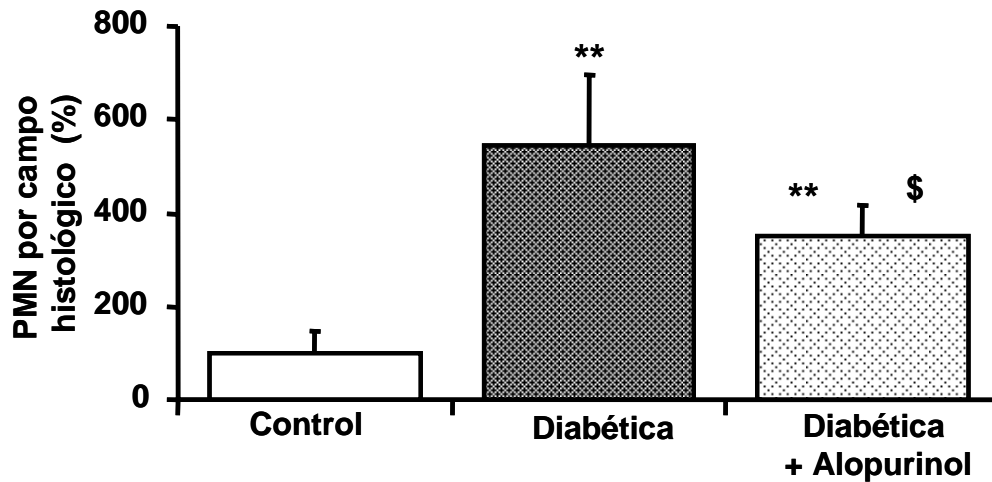


Figura IV.5.: Infiltración de neutrófilos a nivel hepático en ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. **, $p < 0,01$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

IV.6: DETERMINACIÓN DE LA INFILTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

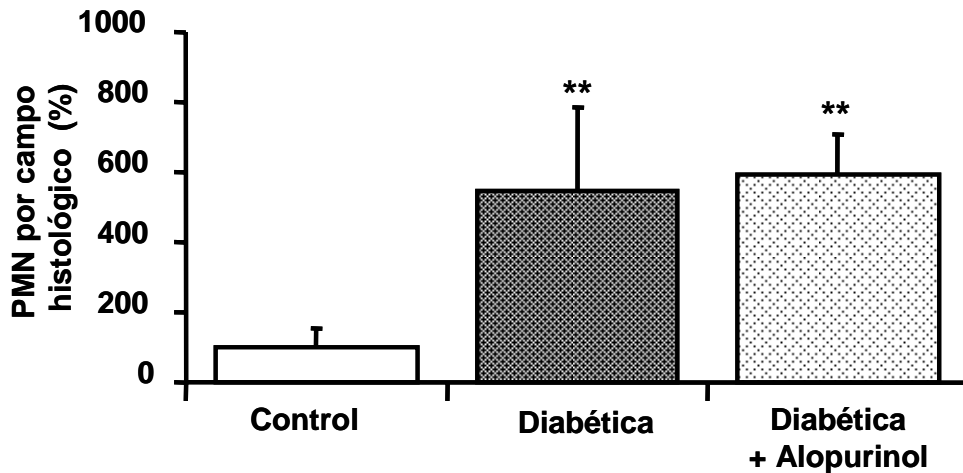


Figura IV.6.: Infiltración de neutrófilos a nivel hepático en ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=5), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. **, $p < 0,01$ vs. Control;

1.4.3. Determinación de las interleucinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β y CINC-1.

Las concentraciones de estas citocinas pro-inflamatorias han sido analizadas tanto en el plasma como en el hígado de nuestros animales.

Como podemos observar en las tablas IV.2 y IV.3 los niveles plasmáticos de IL-6, IL-1 β y CINC-1 no varían significativamente en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

TABLA IV.2: ANÁLISIS DE LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS IL-6, IL-1 β y CINC-1 EN PLASMA DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

12 días (plasma)	IL 6 (pg/mL)	IL 1β (pg/mL)	CINC 1 (pg/mL)
Control (4)	142,76 \pm 20,13	23,65 \pm 5,9	163,70 \pm 76,52
Diabética (4)	118,72 \pm 34,70	24,10 \pm 9,94	97,96 \pm 144,10
Diabética + Alopurinol (4)	145,59 \pm 22,44	17,83 \pm 2,48	156,02 \pm 86,01

Tabla IV.2 Efecto de la administración de alopurinol sobre las citocinas en plasma de ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis.

TABLA IV.3: ANÁLISIS DE LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS IL-6, IL-1 β y CINC-1 EN PLASMA DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

28 días (plasma)	IL 6 (pg/mL)	IL 1β (pg/mL)	CINC 1 (pg/mL)
Control (4)	71,11 \pm 8,64	16,57 \pm 4,96	51,17 \pm 2,49
Diabética (4)	96,09 \pm 15,40	17,49 \pm 5,06	64,11 \pm 21,44
Diabética + Alopurinol (4)	115,18 \pm 14,85	14,87 \pm 2,75	50,98 \pm 13,03

Tabla IV.3 Efecto de la administración de alopurinol sobre las citocinas en plasma de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis.

Por el contrario, como podemos observar en las tablas IV.4 y IV.5 los niveles hepáticos de IL-6 y IL-1 β , tanto en el modelo a corto plazo como a largo plazo, aumentan de forma significativa en los grupos diabéticos respecto a los grupos control. En el modelo a corto plazo y, en el caso de IL-6, este incremento es del 57%, siendo del 38% en el modelo a largo plazo. Del mismo modo, IL-1 β en el modelo a corto plazo en el grupo diabético, aumentó en un 70% siendo este incremento del 63% en el grupo tratado durante 28 días.

La administración de alopurinol demostró ser eficaz únicamente en el grupo diabético a corto plazo en el que redujo, de forma significativa, los valores tanto de IL-6 como de IL-1 β . Sin embargo en el grupo al que se mantuvo durante más tiempo con la enfermedad (28 días) no se observó el efecto protector de la administración de alopurinol.

Por su parte los niveles hepáticos de CINC-1, en las dos condiciones de estudios analizadas, no se modificaron. En el grupo diabético y en el grupo tratado con alopurinol, se encontraron valores basales similares al grupo control.

TABLA IV.4: ANÁLISIS DE LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS IL-6, IL-1 β y CINC-1 EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

12 días (hígado)	IL-6 ($\mu\text{g/g}$ de tejido)	IL-1 β ($\mu\text{g/g}$ de tejido)	CINC-1 ($\mu\text{g/g}$ de tejido)
Control (4)	47,1 \pm 5,3	20,7 \pm 5,9	2,0 \pm 0,3
Diabética (4)	72,6 \pm 13,7 *	35,3 \pm 5,2 *	2,6 \pm 0,1
Diabética + Alopurinol (4)	53,0 \pm 06,4 ^S	25,2 \pm 4,9 ^S	2,9 \pm 0,4

Tabla IV.4 Efecto de la administración de alopurinol sobre las citocinas en hígado de ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control; ^S, $p < 0,05$ vs. Diabética.

TABLA IV. 5: ANÁLISIS DE LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS IL-6, IL-1 β y CINC-1 EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

28 días (hígado)	IL-6 ($\mu\text{g/g}$ de tejido)	IL-1 β ($\mu\text{g/g}$ de tejido)	CINC-1 ($\mu\text{g/g}$ de tejido)
Control (4)	46,7 \pm 5,6	24,7 \pm 2,7	2 \pm 0,1
Diabética (4)	63,2 \pm 2,9 **	40,4 \pm 6,7 **	2,3 \pm 0,4
Diabética + Alopurinol (4)	56,3 \pm 3,6 *	34,7 \pm 1,6 **	2 \pm 0,2

Tabla IV.5 Efecto de la administración de alopurinol sobre las citocinas en hígado de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. * y **, $p < 0,05$ y $0,01$ vs. Control;

2.- ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A DOS MODELOS, DE DISTINTA DURACIÓN, DE DIABETES EXPERIMENTAL EN ANIMALES.

2.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL EN EL ESTATUS DE GLUTATIÓN SANGUÍNEO.

Nuestro grupo de investigación lleva años trabajando en el estudio del papel que juega la xantina oxidasa en la generación de radicales libres en la diabetes mellitus. Un indicador característico de estrés oxidativo es el aumento de la concentración de glutatión oxidado con la consiguiente alteración del estado redox del glutatión. Esto se traduce en un aumento del cociente GSSG/GSH (Ver introducción). Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue el de confirmar si la diabetes, en nuestros modelos experimentales, lleva asociado un daño oxidativo que se manifiesta en una alteración del estatus de glutatión sanguíneo. Con este objetivo determinamos la concentración de GSH, GSSG y calculamos el cociente GSSG/GSH en la sangre de nuestros animales.

En figura IV.7 se puede observar un incremento significativo del cociente en el grupo diabético (12 días) respecto a los valores del grupo control. Sin embargo el grupo diabético tratado con alopurinol no presentó dicho incremento. Como en el estudio realizado a 12 días, decidimos analizar el cociente GSSG/GSH en sangre venosa de los animales tratados durante 28 días. Como podemos observar en la figura IV.8 no encontramos ningún cambio significativo, en este parámetro, al comparar los distintos grupos y tratamientos.

FIGURA IV. 7: COCIENTE (GSSG/GSH) x 100 EN SANGRE DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

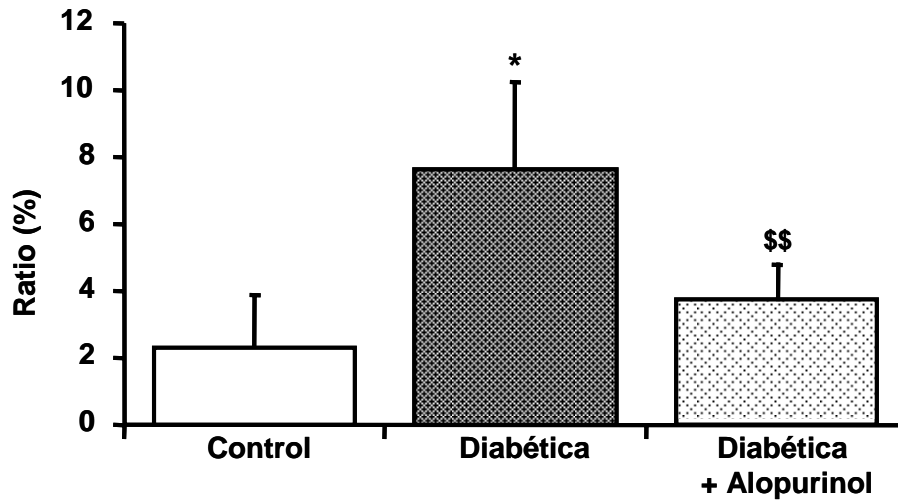


Figura IV.7.: Cociente (gssg/gsh) en sangre de ratas diabéticas durante 12 días . Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=5), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control; \$\$, $p < 0,01$ vs. Diabética.

FIGURA IV.8: COCIENTE (GSSG/GSH) x 100 EN SANGRE DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

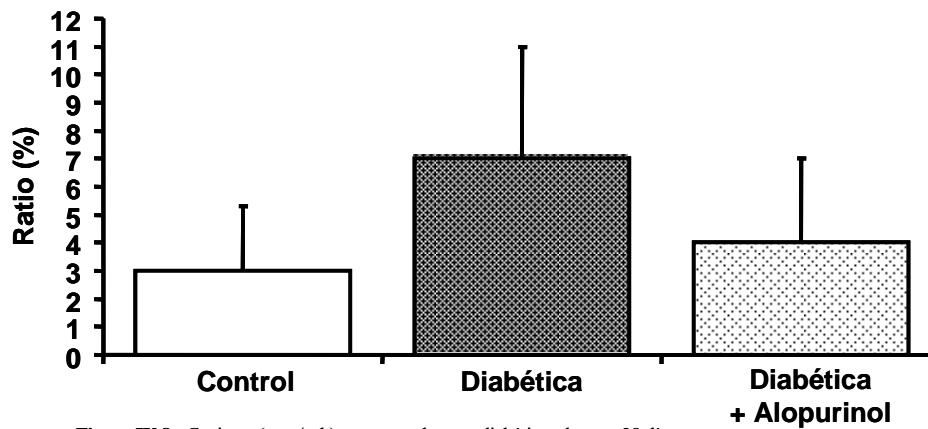


Figura IV.8.: Cociente (gssg/gsh) en sangre de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4).

2.2.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE EL ESTATUS DE GLUTATIÓN HEPÁTICO.

El hígado es un tejido muy activo en la diabetes. Por ese motivo decidimos estudiar el efecto de la enfermedad sobre el cociente GSSG/GSH en el hígado de nuestros animales. Los resultados se recogen en la figura IV.9 donde podemos observar un incremento significativo de los valores del cociente en el grupo diabético, durante 12 días, si lo comparamos con el grupo control. El tratamiento con alopurinol, sin embargo, y también de forma significativa previno dicho incremento.

El efecto de la enfermedad, en el grupo diabético durante 28 días, sobre el cociente GSSG/GSH hepático, lo podemos observar en la figura IV.10. Del mismo modo que en el modelo experimental a corto plazo, tras 28 días de diabetización de los animales observamos un incremento significativo en este marcador de estrés oxidativo al compararlo con el grupo control. En este caso, sin embargo, la administración de alopurinol no tuvo el efecto observado en el modelo anterior (no disminuyó de forma significativa los valores del cociente).

FIGURA IV. 9: COCIENTE (GSSG/GSH) x 100 EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

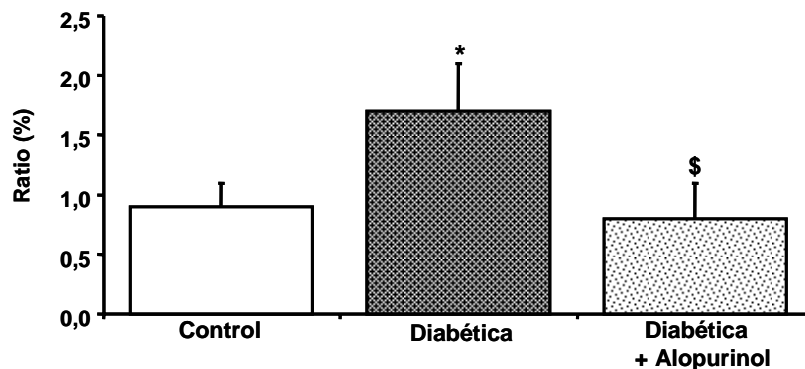


Figura IV.9.: Cociente (gssg/gsh) en hígado de ratas diabéticas durante 12 días . Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=6) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney.

*, $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

FIGURA IV. 10: COCIENTE (GSSG/GSH) x 100 EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

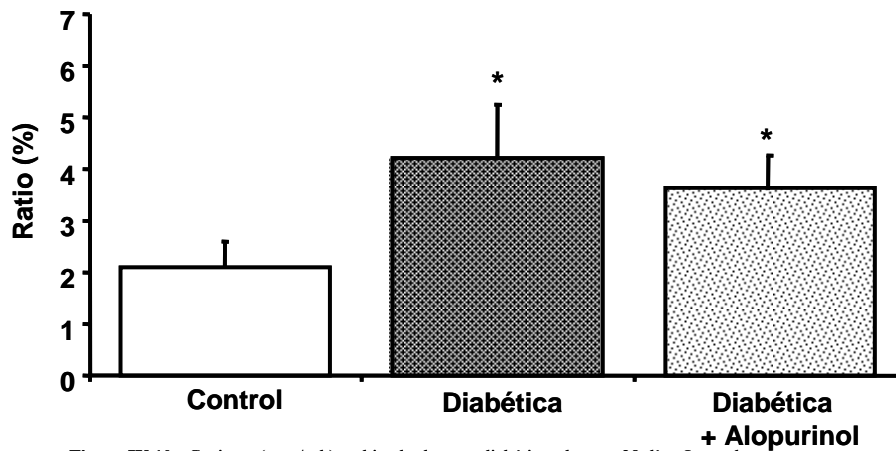


Figura IV.10.: Cociente (gssg/gsh) en hígado de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=6) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control;

2.3.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LOS NIVELES DE MDA EN PLASMA.

Como previamente hemos indicado en la introducción de la presente tesis doctoral, el efecto de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados es una cascada de reacciones que se conoce con el nombre de lipoperoxidación. La degradación de los lipoperóxidos da lugar a la formación de una gran variedad de aldehídos entre los que se encuentran el 4-hidroxinonenal, y el MDA. Este último ha sido el parámetro determinado, en este apartado de la tesis, como índice de daño a lípidos.

Como observamos en la figura IV.11, en nuestro modelo experimental de ratas diabéticas durante 12 días, no existe un aumento en los niveles de MDA en plasma. Sin embargo, este incremento se hizo evidente cuando prolongamos el estudio en el modelo de 28 días. En la figura IV.12 observamos un aumento significativo en los niveles

de MDA en plasma en el grupo diabético durante 28 días. La administración de dos dosis de alopurinol (32 mg/kg de peso) en las 30 y 6 horas previas al sacrificio de los animales, no tuvo ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de este marcador de lipoperoxidación.

FIGURA IV. 11: NIVELES DE MDA EN PLASMA DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

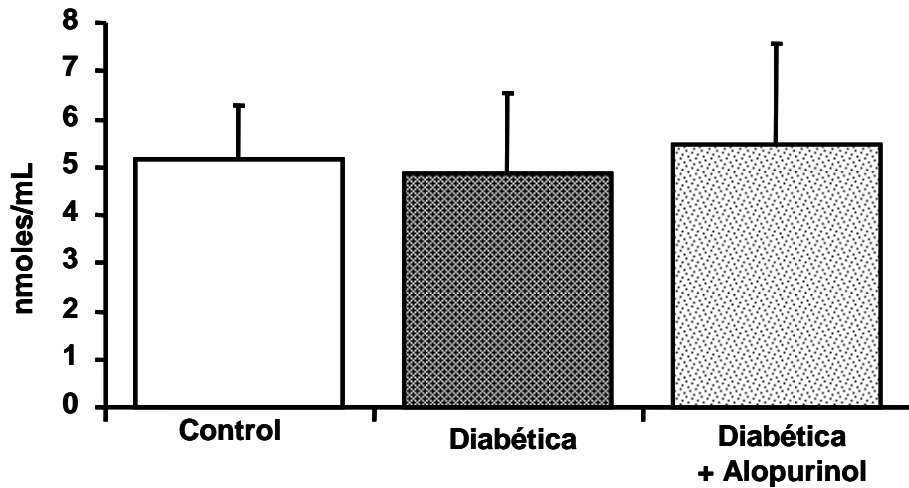


Figura IV.11.: Efecto de la administración de alopurinol sobre la concentración plasmática de lipoperóxidos en ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=7) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5).

FIGURA IV.12: NIVELES DE MDA EN PLASMA DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

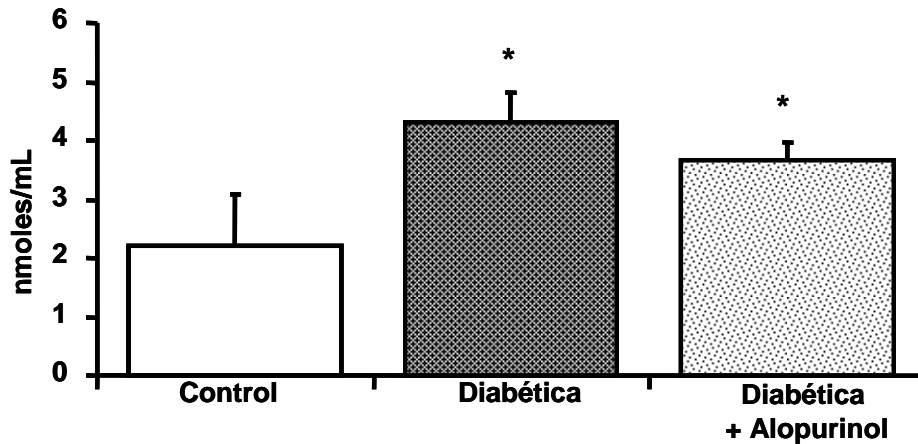


Figura IV.12: Efecto de la administración de alopurinol sobre la concentración plasmática de lipoperóxidos en ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control;

2.4.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LOS NIVELES DE MDA EN HÍGADO.

Cuando estudiamos el hígado de nuestros animales observamos un aumento significativo en los niveles de MDA en los dos grupos diabéticos, 12 y 28 días, con respecto a sus respectivos grupos control. En ambos casos la administración de alopurinol previno el incremento en este índice de liperoxidación (Ver figuras IV.13 y IV.14).

FIGURA IV.13: NIVELES DE MDA EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

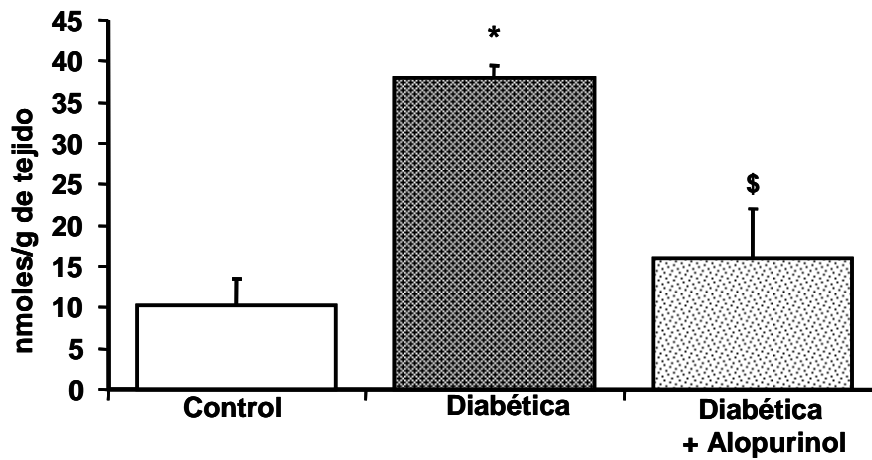


Figura IV.13: Efecto de la administración de alopurinol sobre la concentración hepática de lipoperóxidos en ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4).

Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney.

*, $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

FIGURA IV.14: NIVELES DE MDA EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

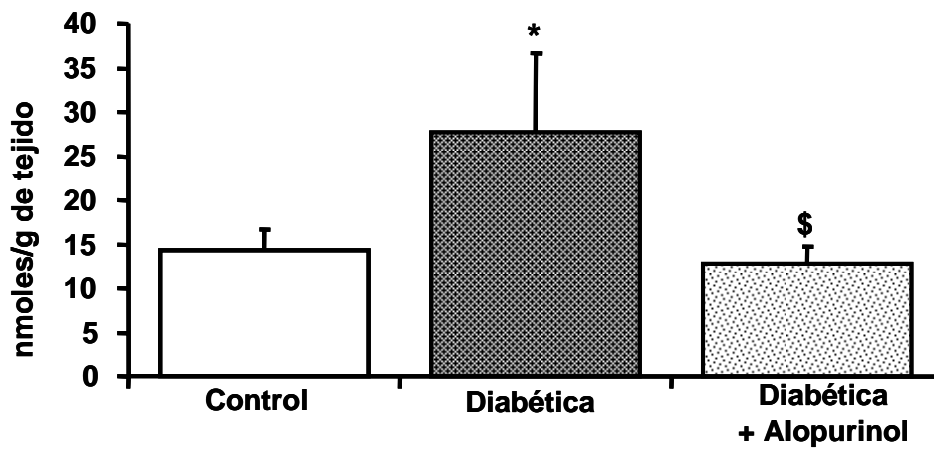


Figura IV.14: Efecto de la administración de alopurinol sobre la concentración hepática de lipoperóxidos en ratas diabéticas de 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney.

*, $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

2.5.-EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA EN PLASMA DE RATA.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la xantina oxidasa está implicada en la generación de radicales libres en la diabetes, tanto tipo I (humana) como experimental. El objetivo de este apartado de los resultados fue el de confirmar que existe un aumento de la actividad xantina oxidasa en plasma de animales diabéticos así como el efecto de la administración de su inhibidor, el alopurinol. Las figuras IV.15 y IV.16 muestran un aumento significativo de la actividad plasmática de la xantina oxidasa tanto en el modelo de diabetes a corto plazo (12 días) como en el modelo a largo plazo (28 días), frente al grupo control. Las figuras también muestran como la administración de alopurinol disminuyó de forma muy significativa la actividad de la enzima, reduciendo sus valores plasmáticos prácticamente a 0 (U/L)

FIGURA IV. 15: ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA EN PLASMA DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

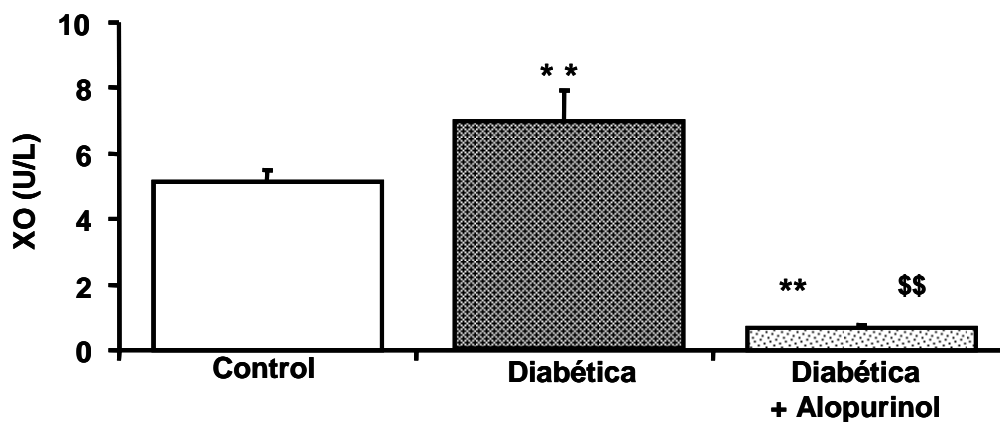


Figura IV.15: Actividad xantina oxidasa en plasma de ratas diabética durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=5), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. **, $p < 0,01$ vs. Control; \$\$, $p < 0,01$ vs. Diabética.

FIGURA IV. 16: ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA EN PLASMA DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

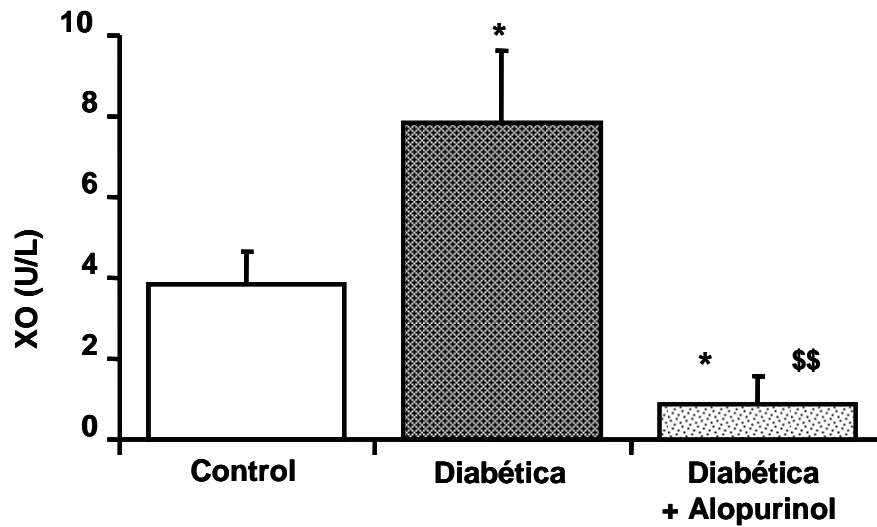


Figura IV.16: Actividad xantina oxidasa en plasma de ratas diabética durante 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=5), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control; \$\$, $p < 0,01$ vs. Diabética.

2.6.-EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA XANTINA OXIDASA EN HÍGADO DE RATA.

A raíz de los resultados obtenidos en plasma de rata, nos propusimos estudiar la actividad de la xantina oxidasa en otro tejido. Los tejidos que mayor actividad xantina oxidasa y deshidrogenasa presentan en rata son el hígado y el intestino (ver capítulo de Introducción). Nuestro grupo de investigación demostró en el año 2002 que la xantina oxidasa, en la diabetes, se libera desde el hígado. Por este motivo, decidimos estudiar la posible variación de estas actividades en el tejido hepático en nuestros dos modelos experimentales. Estos resultados se muestran en las Figura IV.17 y IV.18. Como podemos observar en dichas figuras, la diabetes

experimental en ratas lleva asociado un aumento ($p < 0.05$) en la actividad xantina oxidasa. La administración de alopurinol inhibe, de forma significativa, dicho incremento.

FIGURA IV.17: ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

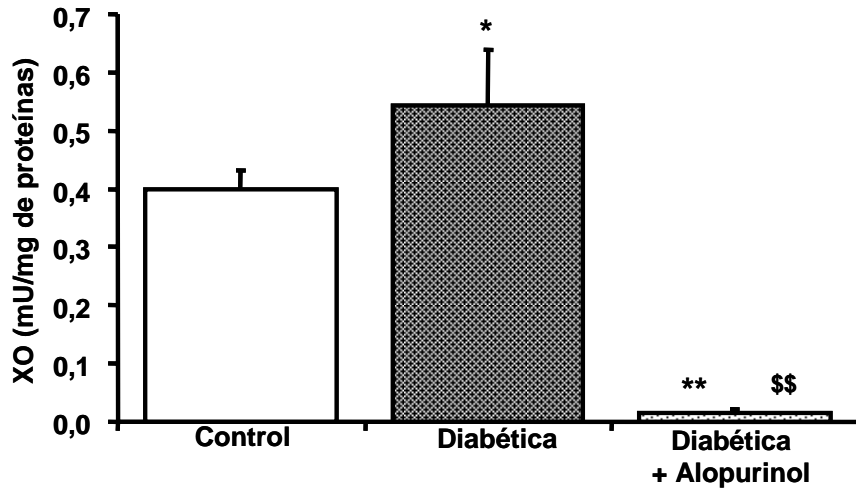


Figura IV.17: Actividad xantina oxidasa en hígado de ratas diabética durante 12 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=4). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. * y **, $p < 0,05$ y $0,01$ vs. Control; \$\$, $p < 0,01$ vs. Diabética.

FIGURA IV.18: ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

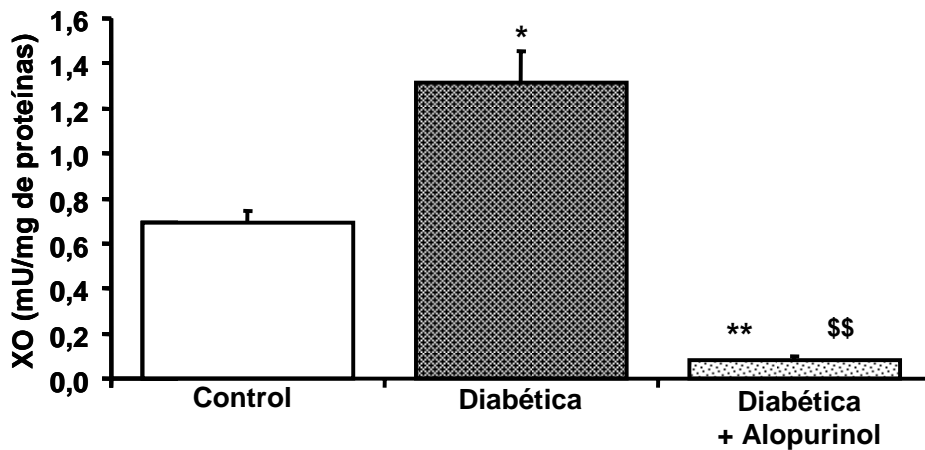


Figura IV.18: Actividad xantina oxidasa en hígado de ratas diabética de 28 días. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=5), grupo diabético (n=4) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. * y **, $p < 0,05$ y $0,01$ vs. Control; \$\$, $p < 0,01$ vs. Diabética.

2.7.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas. Éste suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Ver introducción). En nuestro estudio determinamos la oxidación de proteínas en hígado de rata utilizando la técnica del Western blotting. Con esta técnica detectamos los derivados carbonilo formados durante la diabetes por su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina.

Los resultados de la figura IV.19 muestran un aumento de la oxidación de proteínas en el grupo diabético, significativo en las de bajo peso molecular. Este aumento se previno de forma significativa, en el grupo de animales que recibieron alopurinol.

FIGURA IV.19: PROTEÍNAS OXIDADAS EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

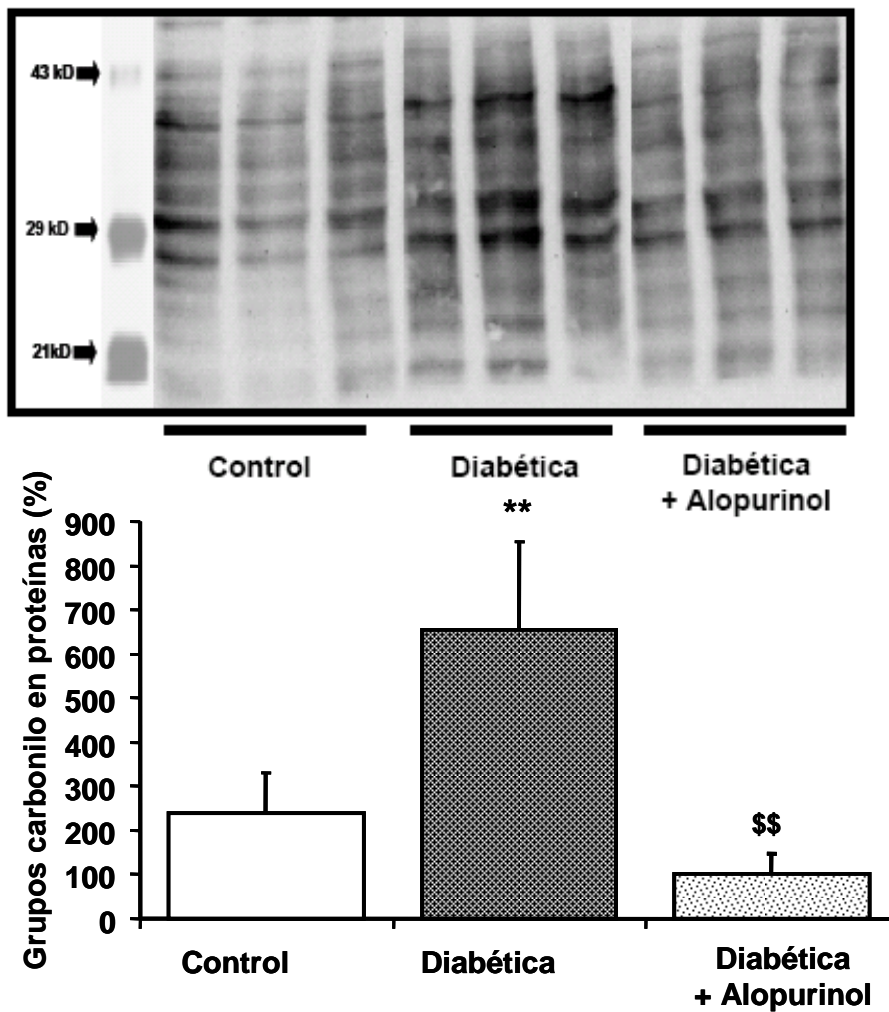


Figura IV.19: Densitometría del western blot de la proteína oxidada con peso molecular de 29 kD, en hígado de ratas diabéticas durante 28 días. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. En la parte de abajo se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=3) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=3). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney.

** $p < 0,01$ vs. Control; \$\$ $p < 0,01$ vs. Diabética.

2.8.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LOS NIVELES DE OXISTEROLES EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO Y LARGO PLAZO.

La oxidación del colesterol libre comporta la adición de un grupo funcional del oxígeno sobre la estructura esteroidea del anillo o sobre la cadena lateral, con formación de los oxisteroles. La caracterización de los principales oxisteroles de interés biológico se ha efectuado en los dos modelos experimentales objeto de nuestro estudio.

Respecto a la distribución de cada oxisterol, en las tablas IV.6 y IV.7 observamos el porcentaje de fracción molar de cada compuesto. Entre los oxisteroles de más presencia en el grupo de ratas diabéticas durante 12 días encontramos un aumento en el 7α -OH y el TRIOL, al compararlos con el grupo control. Sin embargo el grupo diabético tratado con alopurinol no presentó dicho incremento.

En la tabla IV.7 en los grupos de ratas en las que la diabetes se mantuvo durante 28 días, encontramos que el 7β -OH resulta ser el oxisterol que más aumenta seguido del β -EPOXY. Respecto al 7β -OH y en el grupo de animales diabéticos, observamos un incremento significativo en comparación con el grupo control. La administración de alopurinol no disminuye dicho incremento de forma estadísticamente significativa.

TABLA IV.6: % FRACCIÓN MOLAR DE OXISTEROLES EN HÍGADO DE RATA. TRATAMIENTO A CORTO PLAZO.

12 días	7a-OH %	7b-OH %	b-epoxy %	a-epoxy %	triolo %	7-keto %
Control (4)	5,02 ± 0,23	35,28 ± 1,24	24,69 ± 3,42	6,60 ± 1,01	5,93 ± 1,01	21,46 ± 2,34
Diabética (4)	10,62 ± 1,47 *	41,99 ± 12,49	15,51 ± 2,49	4,76 ± 1,56	13,74 ± 1,68 *	13,0 ± 1,51
Diabética + Alopurinol (4)	6,10 ± 1,95 &	64,75 ± 16,74	13,56 ± 2,43	3,25 ± 0,94	3,40 ± 1,31 &	16,81 ± 10,51

Tabla IV.6; Distribución en porcentaje de fracción molar de cada oxisterol en hígado de ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media ± desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control; &, $p < 0,05$ vs. Diabética.

TABLA IV.7: % FRACCIÓN MOLAR DE OXISTEROLES EN HÍGADO DE RATA. TRATAMIENTO A LARGO PLAZO.

28 días	7a-OH %	7b-OH %	b-epoxy %	a-epoxy %	triolo %	7-keto %
Control (4)	2,12 ± 0,01	53,63 ± 6,58	18,18 ± 2,09	5,13 ± 1,12	12,39 ± 6,26	6,37 ± 1,79
Diabética (4)	3,37 ± 0,43	70,37 ± 0,93 *	10,21 ± 1,04	2,97 ± 0,69	3,17 ± 0,03	7,66 ± 0,54
Diabética + Alopurinol (4)	2,25 ± 0,38	64,14 ± 9,87	15,76 ± 3,04	4,35 ± 1,20	4,31 ± 1,59	8,96 ± 4,07

Tabla IV.7: Distribución en porcentaje de fracción molar de cada oxisterol en hígado de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media ± desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control;

La tabla IV.8. representa el porcentaje de oxisteroles totales, respecto al colesterol presente en el hígado de ratas diabéticas durante 12 días. Como se puede observar entre los tres diferentes grupos experimentales no existe ningún cambio significativo.

TABLA IV.8: PORCENTAJE DE OXISTEROLES TOTALES RESPECTO AL COLESTEROL EN HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

12 días	Oxisteroles totales / Colesterol %
Control (4)	4,02 ± 0,23
Diabética (4)	3,57 ± 1,12
Diabética + Alopurinol (4)	4,44 ± 1,23

Tabla IV.8: Porcentajes de oxisteroles totales respecto al colesterol en hígado de ratas diabéticas durante 12 días. Los valores se expresan como media ± desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis

El porcentaje de oxisteroles respecto al colesterol, sin embargo, aumenta en el grupo diabético mantenido durante 28 días. La administración de alopurinol, en este caso, no tiene ningún efecto. Ver tabla IV.9.

TABLA IV.9: PORCENTAJE DE OXISTEROLES TOTALES RESPECTO AL COLESTEROL EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

28 días	Oxisteroles totales / Colesterol %
Control (4)	3,69 ± 0,39
Diabética (4)	6,94 ± 0,07 *
Diabética + Alopurinol (4)	7,01 ± 0,77 *

Tabla IV.9: Porcentajes de oxisteroles totales respecto al colesterol en hígado de ratas diabéticas durante 28 días. Los valores se expresan como media ± desviación estándar para el número de animales que aparece entre paréntesis. Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control.

3.- IMPLICACIÓN DE NF- κ B y LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN EN LA DIABETES MELLITUS INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune e inflamatoria de los islotes pancreáticos. El desarrollo de la enfermedad se acompaña de la expresión coordinada de varios genes inflamatorios en los islotes de Langerhans. Los factores de transcripción que regulan la expresión de genes inflamatorios pueden ser críticos en el desarrollo de la diabetes mellitus (Ver introducción).

Uno de los factores de transcripción, sensibles al estado redox y que juega un importante papel en la expresión de genes inflamatorios, es el factor nuclear κ B. En condiciones de reposo, esto es, de no-activación de NF- κ B, este factor nuclear está en realidad en forma de heterodímero, pues NF- κ B permanece retenido en el citoplasma gracias a la formación de un complejo con su inhibidor, I κ B, el otro miembro clave de este sistema de activación transcripcional. I κ B presenta a su vez diferentes miembros: I κ B α , β , y (p105), δ (p100), ϵ y bcl3. De todos ellos, el más importante es sin duda I κ B α por su mayor presencia.

En este estudio nos planteamos determinar si la inducción de diabetes en un grupo de animales podría activar la cascada de señalización de NF- κ B y el posible efecto de la administración de alopurinol.

3.1.- FOSFORILACIÓN DE IKK- β EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE ANIMALES DIABÉTICOS DURANTE 12 DÍAS. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

La cascada de señalización que induce la activación del factor nuclear κ B se inicia con la fosforilación del complejo I κ B kinasa (IKK), de alto peso molecular. Además de las dos subunidades catalíticas: IKK α o IKK β , este complejo contiene una subunidad reguladora llamada NEMO (Modulador esencial de NF- κ B) o IKK γ y finalmente IKAP (Proteína asociada al complejo IKK). Esta última parece actuar como mantenedor físico de la estructura.

La fosforilación de IKK α e IKK β constituye el paso previo para la activación del complejo. Las Serinas 180 y 181 son los sitios específicos cuya fosforilación supone un cambio conformacional de la kinasa. Por este motivo decidimos de medir la proteína p-IKK β en nuestro modelo de diabetes mantenida durante 12 días.

En la figura IV.20 se puede observar, como la proteína se fosforila en el grupo diabético y como en el grupo diabético con alopurinol y el grupo control no se modifican.

FIGURA IV. 20: p-IKK β EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

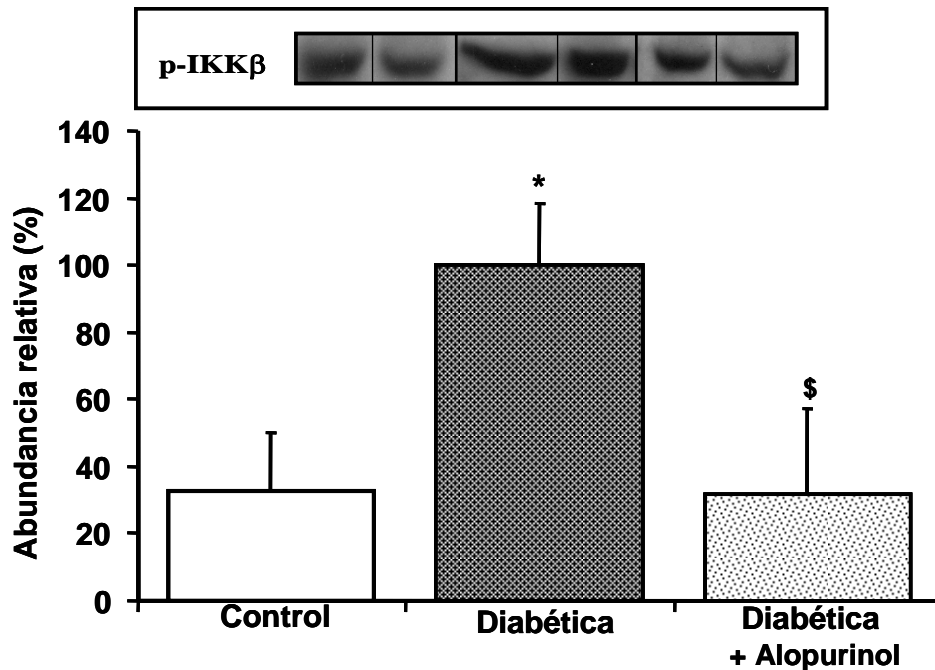


Figura IV.20: Determinación de la proteína p-IKK- β en hígado de ratas diabéticas durante 12 días mediante la técnica de western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. No se han observado cambios en la expresión de la proteína α -tubulina en el mismo western blotting. En la parte de abajo se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=3) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=3). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

3.2.- EXPRESIÓN DE I κ B- α EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE ANIMALES DIABÉTICOS DURANTE 12 DÍAS. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

Una vez comprobada la activación de IKK β en el hígado de animales diabéticos, nos propusimos un estudio de la cascada de señalización más inmediata que condiciona la traslocación al núcleo de este factor de transcripción. En primer lugar nos centramos en el análisis de la proteína I κ B- α , inhibidor directo de NF- κ B.

Determinamos la expresión de I κ B- α en los extractos citosólicos de hígado de nuestros grupos de animales.

En la Figura IV.21. se muestra como la inducción de la diabetes con estreptozotocina provoca una disminución de la expresión de I κ B- α , con respecto al grupo control. La expresión de la proteína inhibidora de NF- κ B, sin embargo, no se modificó con respecto a los valores del grupo control, en el grupo tratado con alopurinol.

FIGURA IV. 21: I κ B- α EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

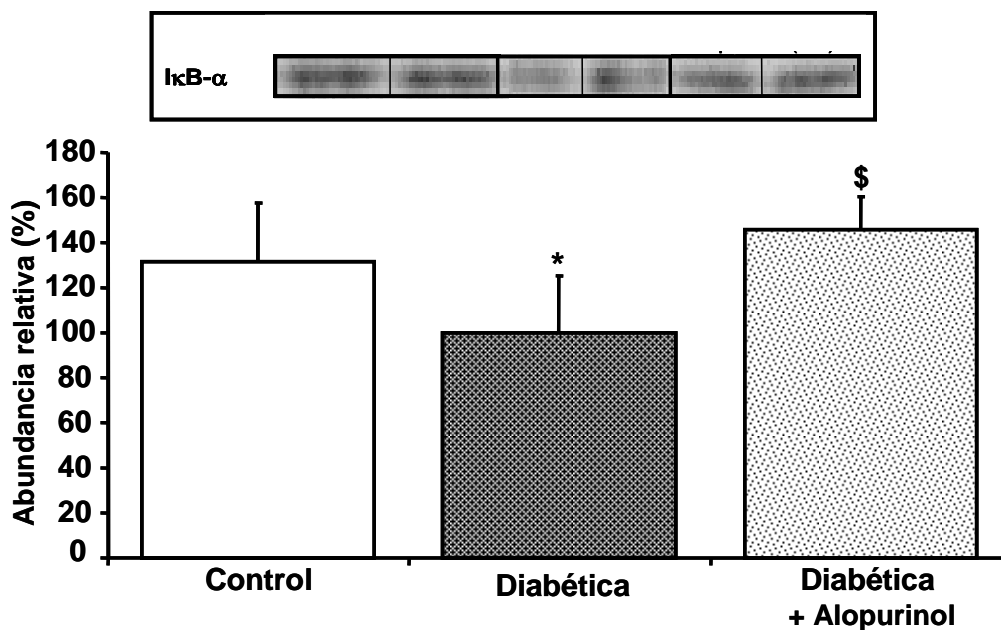


Figura IV.21: Determinación de la proteína I κ B- α en hígado de ratas diabéticas durante 12 días mediante la técnica de western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. No se han observado cambios en la expresión de la proteína α -tubulina en el mismo western blotting. En la parte de abajo se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=3) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=3).

Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney.

* $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

3.3.- FOSFORILACIÓN DE I κ B- α EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE ANIMALES DIABÉTICOS DURANTE 12 DÍAS. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

La fosforilación de I κ B- α constituye el paso previo para la degradación de la proteína. Se ha comprobado que la fosforilación de I κ B- α , en las Serinas 32 y 36, estimula la conjugación con la ubiquitina y posterior degradación por el proteasoma de la proteína, lo que supone la activación de NF- κ B. Por este motivo decidimos medir p-I κ B- α en nuestro modelo de ratas tratadas durante 12 días. En la figuras IV.22 observamos como la proteína se fosforila en el grupo de animales diabéticos, mientras que la administración de alopurinol supone una disminución clara de dicha fosforilación.

FIGURA IV. 22: p-I κ B- α EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

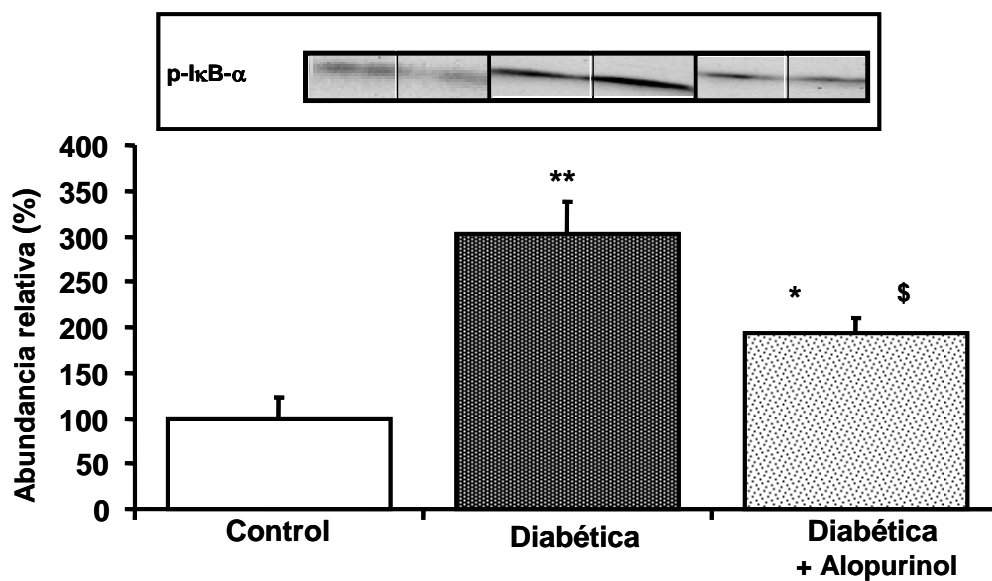


Figura IV.22: Determinación de la proteína p-I κ B- α en hígado de ratas diabéticas durante 12 días mediante la técnica de western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. No se han observado cambio en la expresión de la proteína α -tubulina en el mismo western blotting. En la parte de abajo se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=3) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=3). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. * y **, $p < 0,05$ y $0,01$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

3.4.-TRASLOCACIÓN AL NÚCLEO DE NF- κ B EN HÍGADO DE ANIMALES DIABÉTICOS DURANTE 12 DÍAS. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

La forma activa de NF- κ B en células está formada normalmente por dos subunidades con capacidad de unión a ADN: p50 y p65 (también llamada Rel A). Este heterodímero presenta una elevada afinidad por decámeros de ADN de secuencia consenso 5' GGGRNNYYCC 3'. Tanto p50 como p65 presentan una región de aproximadamente 300 aminoácidos con la homología mínima necesaria para la unión a ADN y para la dimerización.

Dada la importancia que NF- κ B puede tener en la diabetes decidimos estudiar la activación del factor nuclear κ B en extractos nucleares de hígado con la técnica del Western blot. Utilizamos, para ello, un anticuerpo específico de la subunidad p65 del factor de transcripción.

En la Figura IV.23, se muestra como la diabetes induce la aparición de la subunidad p65 en el interior del núcleo y por tanto la activación de NF- κ B. De la misma forma podemos ver como la administración de alopurinol previene dicha activación devolviendo los niveles de NF- κ B a valores cercanos al reposo.

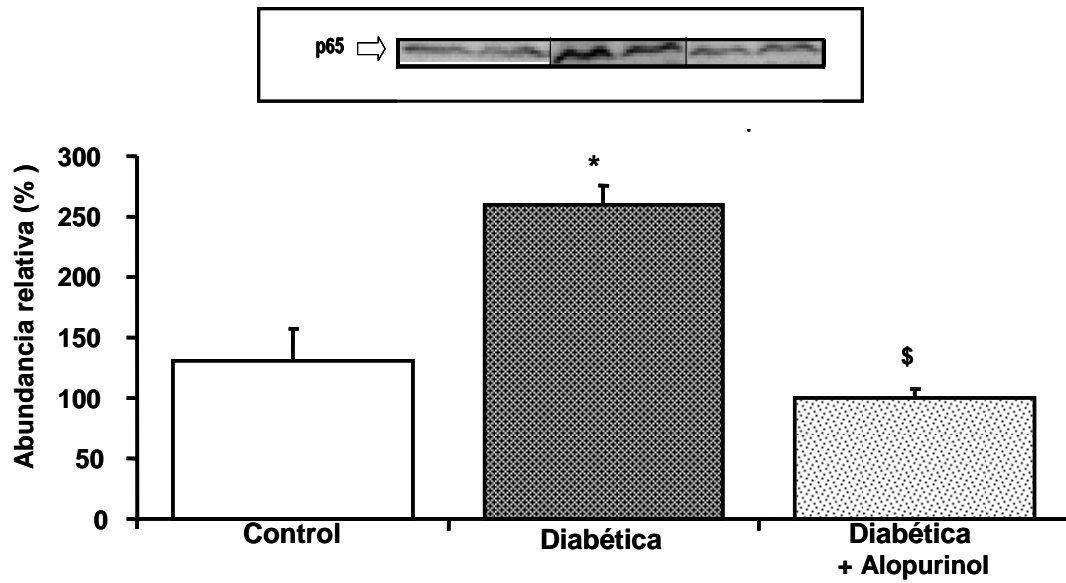
FIGURA IV. 23: NF- κ B (p65) EN EXTRACTOS NUCLEARES DE HÍGADO DE RATA. MODELO A CORTO PLAZO.

Figura IV.23: Determinación del factor de transcripción NF- κ B en hígado de ratas diabéticas durante 12 días, mediante western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. En la grafica inferior se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=3), grupo diabético (n=3) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=3). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney.

*, $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

3.5.- EXPRESIÓN DE iNOS y COX-2 EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE ANIMALES DIABÉTICOS DURANTE 28 DÍAS. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

En los resultados presentados hasta ahora hemos visto como la diabetes puede activar la vía por la que señales extracelulares se convierten en respuestas intracelulares, en definitiva puede influir en la señalización intracelular. La inhibición de esta cascada de señalización con alopurinol apunta hacia el estrés oxidativo, como mecanismo de control de dicho proceso, y concede protagonismo a las ERO derivadas de la xantina oxidasa.

En este apartado nos planteamos estudiar el efecto de la diabetes sobre la expresión de las proteínas iNOS y COX2 en extractos citosólicos y el efecto de la administración de alopurinol. En la figura IV.24. y IV.25 se muestra como la diabetes induce la expresión de ambas proteínas (iNOS y COX2), mientras que la administración de alopurinol supone una disminución clara de dicha inducción.

FIGURA IV. 24: EXPRESIÓN DE iNOS EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

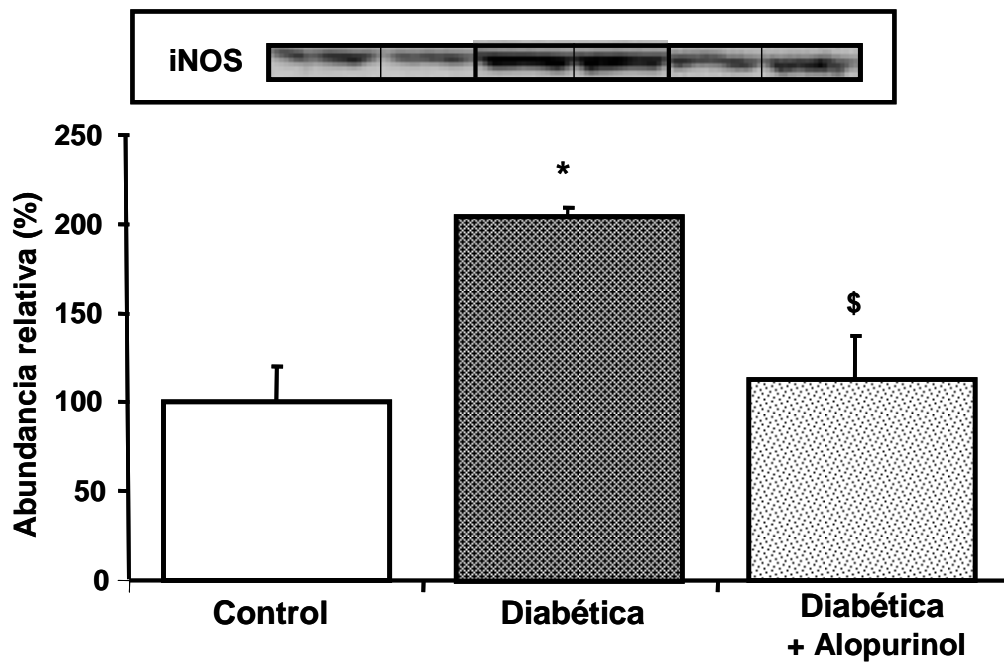


Figura IV.24: Determinación de la proteína iNOS en hígado de ratas diabéticas durante 28 días, mediante western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. No se han observado cambio en la expresión de la proteína α -tubulina en el mismo western blotting. En la grafica inferior se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=5). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *U* de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

FIGURA IV. 25: EXPRESIÓN DE COX-2 EN HÍGADO DE RATA. MODELO A LARGO PLAZO.

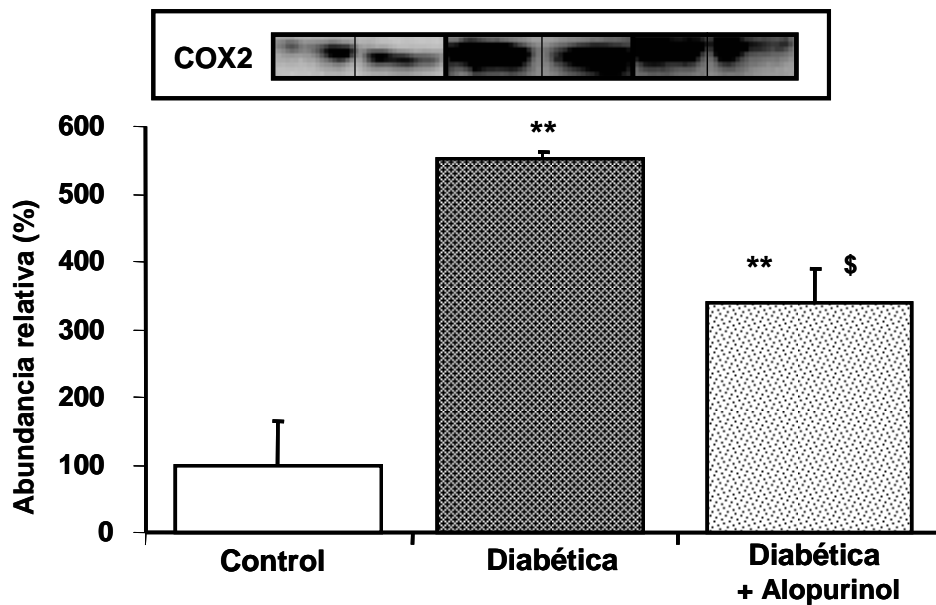


Figura IV.25: Determinación de la proteína COX2 en hígado de ratas diabéticas durante 28 días, mediante western blotting. La figura superior muestra la imagen de un experimento representativo. No se han observado cambios en la expresión de la proteína α -tubulina en el mismo western blotting. En la gráfica inferior se muestran los resultados densitométricos. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar. Grupo control (n=4), grupo diabético (n=5) y grupo diabético tratado con alopurinol (n=54). Los grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. **, $p < 0,01$ vs. Control; \$, $p < 0,05$ vs. Diabética.

3.6.- EXPRESIÓN DE α -TUBULINA EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE RATA.

Determinamos la expresión de la proteína α -tubulina como normalizador en los extractos citosólicos de hígado de nuestros grupos experimentales. En las figuras IV.26 observamos como no existen diferencias significativas en la expresión de esta proteína entre las distintas muestras. Pese a que realizamos este ensayo en cada uno de los geles mostrados en la tesis doctoral, hemos considerado

conveniente presentar en este apartado únicamente un gel representativo de toda la serie realizada.

FIGURA IV. 26: WESTERN BLOT REPRESENTATIVO DE α TUBULINA EN EXTRACTOS CITOSÓLICOS DE HÍGADO DE RATA.

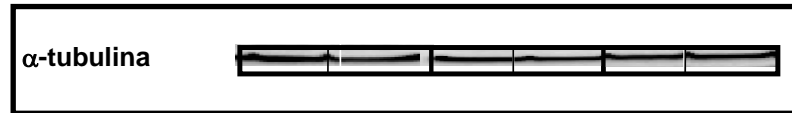


Figura IV.26: Western blot de tubulina. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del producto de SIGMA ALDRICH.

V-DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1.- ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES EXPERIMENTAL.

1.1. OXIDACIÓN DEL GLUTATIÓN

La cantidad de artículos que relacionan la diabetes mellitus con el estrés oxidativo ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años. Una búsqueda en la base de datos PubMed muestra que el número de publicaciones en esta área entre los años 1995-2005 es 26 veces mayor que en el período comprendido entre 1985-1995.

Las primeras observaciones recogidas, en este sentido, mostraban una disminución en el contenido de GSH en los eritrocitos de animales diabéticos y un incremento en los peróxidos lipídicos en plasma. Del mismo modo se han demostrado modificaciones en la actividad de enzimas antioxidantes (195, 272), en el metabolismo hepático del glutatión (273) (221) y en la producción de radicales libres debido a reacciones asociadas con metales pesados (199). Los resultados que presentamos en la presente tesis doctoral corroboran estos datos. De hecho, hemos observado que la diabetes va acompañada de una modificación del estatus de glutatión, fundamentalmente debido a un aumento del GSSG, tanto en sangre, como en hígado de ratas diabetizadas con estreptozotocina. Debemos tener en cuenta que el estatus del glutatión es uno de los mejores indicadores de estrés oxidativo (121). Algunos autores han estudiado el efecto de la diabetes sobre los niveles de glutatión. Así en ratas diabetizadas con estreptozotocina se ha observado una disminución del glutatión en cristalino (202) en el hígado (274, 275) y en el cerebro (276). Asimismo se han encontrado resultados en ese sentido en

eritrocitos de personas diabéticas tipo I (277) y tipo II (278). En el contexto de estrés oxidativo, es mucho más relevante estudiar el estatus del glutatión (relación glutatión oxidado/glutatión reducido) que los niveles absolutos del mismo, ya que estos últimos están sujetos a variaciones severas en función del estado nutricional, sobre todo a nivel hepático (279). Pocos autores han estudiado el estatus del glutatión en la diabetes, quizás debido a la dificultad para determinar correctamente la forma oxidada (21). McLennan y colaboradores (1991) (273) analizaron el estatus hepático de glutatión en ratas diabetizadas con estreptozotocina y, al contrario que los resultados que presentamos en esta tesis doctoral, no observaron una oxidación del glutatión hepático. Estas discrepancias se pueden deber a problemas metodológicos, ya que estos autores obtienen un valor de glutatión oxidado de 1085 nmoles/g de hígado en ratas controles para un glutatión total de 5730 nmoles/g de hígado. Si se asume que la glutatión reductasa se encuentra en equilibrio, la relación GSH/GSSG debería de ser en hígado de al menos 10^5 (128). Esta relación jamás se ha obtenido, por tanto debemos suponer que la reacción catalizada por la glutatión reductasa no se encuentra en equilibrio. Sin embargo, todos los trabajos experimentales que han utilizado una metodología adecuada, han obtenido una relación GSH/GSSG en hígado de aproximadamente dos ordenes de magnitud (280) (281) (282). En el estudio realizado por McLennan y colaboradores (1991) (273), los valores de glutatión reducido solamente triplican los valores de la forma oxidada, por lo que sospechamos que durante el procesado de la muestra se ha producido una auto-oxidación importante del glutatión reducido.

1.2. NIVELES DE LIPOPERÓXIDOS.

Otro parámetro de estrés oxidativo que hemos determinado son los niveles de malondialdehído (MDA), en plasma e hígado de ratas diabetizadas con estreptozotocina. El MDA es un producto formado a partir de la hidrólisis ácida, a 100° C, de los lipoperóxidos. Los lipoperóxidos se forman como resultado de una cadena de reacciones de peroxidación de lípidos de membranas plasmáticas, que ocurre en presencia de radicales libres de oxígeno. En todos los casos, excepto en los niveles de MDA en el grupo de diabetes a corto plazo, observamos un aumento de la lipoperoxidación asociado a la diabetes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores. Así, por ejemplo, se ha visto un aumento de la lipoperoxidación en pacientes diabéticos respecto a sujetos sanos (204, 283, 284). En ratas diabetizadas con estreptozotocina se ha observado un aumento de la lipoperoxidación en plasma de eritrocitos (285), en corazón (283), en retina (286), en nervio ciático (287), en riñón y en hígado (284). En este último órgano se han estudiado los incrementos en los niveles de TBARS en modelos experimentales de diabetes inducida con estreptozotocina y mantenida entre 0 y 6 semanas. En este sentido se ha demostrado que los niveles de TBARS aparecen aumentados de forma temprana y aumentan progresivamente. Sin embargo, existe un estudio donde se ha observado una disminución en los niveles de malondialdehído en hígado de ratas diabetizadas con estreptozotocina respecto a los controles (273). Éste es el mismo trabajo donde, como hemos comentado anteriormente, tampoco se observó una oxidación del glutatión hepático.

1.3. PROTEÍNAS OXIDADAS.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (94). Sin embargo, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (95). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica (288), de la afinidad de los factores de transcripción por el DNA (289) y de su susceptibilidad para la proteólisis (290).

La modificación oxidativa de proteínas por ERO ocurre en situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Como consecuencia de dicha modificación, se introducen grupos carbonilo en las proteínas por un mecanismo específico. Los aminoácidos lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (290). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (291). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (98).

Varios grupos de investigación han utilizado la oxidación de proteínas como marcador de estrés oxidativo en hígado, riñón y plasma de animales diabéticos (292) (275, 293, 294). Estos trabajos se han basado en la cuantificación del contenido de carbonilos en las proteínas por su reacción con la dinotrofenilhidracina (DNPH) para formar derivados hidrazona (295) (296). En la presente tesis determinamos la oxidación de proteínas en hígado de rata utilizando la técnica del Western Blotting lo que permite una aproximación al peso

molecular de la proteína oxidada (297). Las señales de oxidación proteica que encontramos fueron especialmente visibles en proteínas con bajos pesos moleculares 20-40 kDa, aunque la diferencia entre los 3 grupos experimentales se evidenció en las proteínas con un peso molecular de ~29 kDa. Esto indica que algunas proteínas son más sensibles a la formación de derivados carbonilo, bajo nuestras condiciones experimentales, que otras. También sugiere que cierta forma de daño oxidativo tiene lugar selectivamente. Nuestros resultados coinciden con los publicados por varios grupos de investigación que han demostrado un aumento en la oxidación de proteínas en extractos citosólicos de hígado de animales diabéticos (292) (275). Sin embargo contrastan con los publicados por el grupo de Portero-Otin (297). Estos autores encontraron una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los niveles de proteínas oxidadas en hígado y riñón de ratas diabetizadas con estreptozotocina. Estas diferencias en los resultados obtenidos consideramos que pueden estar relacionadas con el modelo experimental utilizados por estos autores. De hecho un trabajo publicado en el 1998 demuestra que la peroxidación lipídica, y no la glicación, provoca modificaciones en los grupos carbonilos de las proteínas. Dado que la lipoperoxidación está aumentada en la diabetes, esto podría conducir a un aumento de los grupos carbonilo en las proteínas (298).

1.4. OXISTEROLES.

El colesterol posee un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 del anillo aromático, susceptible de sufrir oxidación. De esta manera, cuando el colesterol, presente en muestras biológicas o en materias primas, u otros productos oleosos que lo contienen, es sometido a una oxidación, da origen a una serie de productos , de diferente estructura,

aún no del todo definidos químicamente, que se identifican colectivamente con el nombre de oxisteroles (106). Distintos estudios *in vitro* han permitido demostrar diferentes actividades bioquímicas y biológicas de estas moléculas (299). Los oxisteroles se han relacionado con el fenómeno de la apoptosis (300, 301) y con las progresión de distintas patologías tales como la arterosclerosis (302). Se sabe que el riesgo de padecer esta enfermedad aumenta significativamente en presencia de altos niveles de 7β -OH en plasma (302). Asimismo, en un estudio epidemiológico publicado en 1999 se evidenció la existencia de una correlación positiva entre el alto riesgo de enfermedad cardiovascular y las elevadas concentraciones plasmáticas de 7β -OH (303). Muchas de estas alteraciones están implicadas también en la diabetes (304). En este sentido las concentraciones de oxisteroles en plasma de pacientes con diabetes se han relacionado con las complicaciones asociadas a esta patología (305) (306).

Nuestros experimentos muestran un incremento en los valores de oxisteroles hepáticos asociados a los dos modelos de diabetes experimental. El 7α -OH se muestra significativamente incrementado en el modelo de diabetes a corto plazo (12 días), mientras que el 7β -OH lo hace en el modelo a largo plazo (28 días). Estos resultados corroboran hallazgos previos publicados por otros grupos de investigación en los que, utilizando un modelo experimental muy similar al nuestro, realizan estas determinaciones en hígado (304) y corazón (307).

La administración de alopurinol mostró ser efectiva en la disminución de los niveles de 7α -OH en el modelo a corto plazo. Sin embargo, en el modelo a largo plazo la administración de alopurinol no tuvo ningún efecto sobre los niveles de oxisteroles aumentados. Estos resultados demuestran que el mecanismo de formación de

radicales libres en un modelo de diabetes experimental a largo plazo (28 días) no sólo implica la activación de la enzima xantina oxidasa.

Pese a las evidencias experimentales mostradas en la presente tesis, la hipótesis de que durante la diabetes se produce un incremento del estrés oxidativo ha sido cuestionada por algunos autores (308). Estos sugirieron que la estreptozotocina genera daño oxidativo *per se* y que, por tanto, no es la enfermedad la responsable del estrés oxidativo determinado en este modelo experimental (308). Sin embargo los siguientes hechos contradicen esta afirmación:

1) Diversos grupos de investigación han demostrado un aumento en distintos marcadores de estrés oxidativo en sujetos diabéticos (221) (264, 309)

2) Se han demostrado modificaciones oxidativas en distintos modelos de diabetes experimental en las que no se ha utilizado estreptozotocina (310, 311)

3) Nuestros experimentos muestran que existe un periodo de tiempo, de aproximadamente una semana, tras la administración de la estreptozotocina, pero antes de que hagan su aparición los signos de diabetes, en los que no observamos ningún cambio en los marcadores de estrés oxidativo. Únicamente cuando la hiperglucemia y la hipercetonemia aparecen observamos aumentos en la oxidación del glutatión e incrementos en los niveles de lipoperóxidos en plasma (221).

2.- DAÑO HEPÁTICO Y DIABETES.

Las complicaciones crónicas de la diabetes son fundamentalmente vasculares. A grandes rasgos éstas pueden afectar tanto a los vasos de mediano o gran calibre (MACROANGIOPATÍA), como a la microcirculación (MICROANGIOPATÍA). Las lesiones microvasculares se localizan típicamente a nivel renal (neuropatía diabética), retiniano (retinopatía diabética) o nervioso (neuropatía diabética) (2). El hígado, por tanto, no es un órgano al que se le haya prestado excesiva atención en la diabetes. En la presente tesis doctoral y en diversos trabajos recogidos en la bibliografía (292) (273) (274) se demuestra que el daño oxidativo ocurre no únicamente en los órganos vulnerables a las complicaciones del diabético, sino también en aquellos órganos sin signos aparentes de complicaciones. En un estudio publicado en 1999 los autores demostraron que en los modelos experimentales de diabetes inducida con estreptozotocina se observa una hepatomegalia que puede ser debida a una hiperplasia temprana y una disminución de la apoptosis (312). Se sabe que la diabetes predispone a esteatohepatitis no alcohólica que progresa en 5-20% de los casos a cirrosis (313) (314). El riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular también está aumentado en personas con diabetes, particularmente entre pacientes con otras causas de enfermedades hepáticas graves, tales como hepatitis C o cirrosis alcohólica (315, 316).

Un estudio epidemiológico reciente ha demostrado que los pacientes diabéticos tienen un riesgo muy elevado (casi el doble) de padecer fallo hepático al compararse con pacientes no diabéticos (316) (317). La diabetes, por tanto, puede desembocar en una enfermedad hepática severa. Entre un 10 y un 20% de pacientes con cirrosis son diabéticos y una gran proporción muestran intolerancia a la glucosa (318) (319).

Además la diabetes descontrolada se acompaña de fallo hepático fulminante (320).

En nuestro modelo experimental de diabetes a corto plazo hemos encontrado un aumento significativo en el marcador de daño hepático ALT y en las áreas de necrosis determinadas mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Los motivos del aumento en el riesgo de fallo hepático en los pacientes diabéticos se desconocen. Algunos autores consideran que la mayor exposición de estos enfermos a medicamentos hepatotóxicos y su mayor susceptibilidad pueden ser una de las causas. (316) (317). Otro de los motivos puede ser el aumento de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos libres que son captados por el hígado en los enfermos de diabetes. Los ácidos grasos libres son potencialmente citotóxicos y causan hinchazón mitocondrial, fragilidad lisosomal y daño a membranas celulares (321).

Los resultados comentados hasta el momento sugieren que el estrés oxidativo asociado a la diabetes es sistémico y no se restringe a los órganos o tejidos que presentan los síntomas clínicos.

3.- DIABETES E INFLAMACIÓN.

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune e inflamatoria de los islotes pancreáticos (322). La inyección de estreptozotocina se puede considerar el modelo animal de diabetes tipo I (323) ya que el paciente diabético, al igual que el animal que recibe una dosis de estreptozocina comparten semejanzas tanto histológicas como clínicas. (322). Diversos e importantes factores pato-fisiológicos en el desarrollo de las complicaciones asociadas a esta enfermedad (hiperglucemia, hiperlipidemia, formación y acumulación de productos de glicación avanzada, estrés oxidativo) y la disminución progresiva y simultánea de los mecanismos de defensa antioxidante pueden desembocar en la activación de NF- κ B (324) (325).

NF- κ B es un factor de transcripción primario, ubicuo y con un mecanismo de activación básicamente único (si se considera al propio factor y a su represor), pero que sin embargo responde a una gran cantidad de señales, y activa también a una importante cantidad de genes (266). NF- κ B tiene una evidente importancia en el sistema inmune (326). Es especialmente conocido por su papel en los mecanismos inflamatorios (y con ellos en las patologías con base inflamatoria, entre otras) por ser un elemento pivotal en el inicio y perpetuación de éstos. Su respuesta a toda una serie de señalizadores iniciales en estos fenómenos y su capacidad para inducir la síntesis de más mediadores de todo tipo han hecho de este heterodímero y la ruta que lo incluye un foco de atención en la investigación relacionada con todo tipo de enfermedades con base inflamatoria como es la diabetes.

El factor de transcripción NF- κ B está compuesto por miembros de la familia Rel. En mamíferos estas proteínas incluyen: (NF- κ B 1), p65 (RelA), p52 (NF- κ B2), RelB, c-Rel, p105, and p100

(265). NF- κ B se encuentra presente en el citoplasma en un estado inactivo, unido a las proteínas inhibitoras I κ B. El factor nuclear se puede activar por una gran cantidad de estímulos tales como: H₂O₂, citocinas pro-inflamatorias TNF- α , interleucinas IL-1,IL-6 y LPS. En el proceso se produce la fosforilación de I κ B α e I κ B β por la I κ B kinasa (IKK). La fosforilación por IKK, dispone a I κ B para la ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteasoma 26S (327).

Recientemente se ha demostrado la presencia de NF- κ B activado en células mononucleares sanguíneas de pacientes diabéticos tipo I (325, 328) y en hígado de animales diabéticos (329). Nuestros resultados concuerdan con los previamente publicados y demuestran que la vía de señalización de NF- κ B es activada durante un modelo de diabetes a corto plazo. El estudio de la secuencia temporal de acontecimientos moleculares muestra un aumento de la subunidad p65 del factor nuclear, en extractos nucleares de hígado en los animales diabéticos durante 12 días. Del mismo modo muestra un descenso en los niveles de I κ B α acompañados por un incremento en la su fosforilación y de la de su Kinasa, IKK β , en los extractos citosólicos de los animales que padecen la enfermedad. Del mismo modo, dos de los genes cuya expresión se encuentra regulada por este factor de transcripción, iNOS y COX-2 (330), mostraron un incremento significativo en su expresión únicamente en el grupo de animales diabéticos durante 28 días. La activación de iNOS contribuye a la hiperfiltración y microalbuminuria que caracteriza la nefropatía diabética temprana (331). La diabetes se ha demostrado que está relacionada con un aumento en la actividad y en la expresión de iNOS en hígado de ratas tratadas con estreptozotocina. Del mismo modo se ha visto que los niveles de óxido nítrico están significativamente elevados en los hígados de animales diabéticos en fases muy

tempranas de la enfermedad (332). En este contexto el óxido nítrico puede reaccionar con el radical superóxido para generar una especie altamente reactiva como es el peroxonitrito, lo que supondría un daño más agresivo tanto oxidativo como nitrosativo.

Por otra parte la activación del Factor Nuclear κ B, en nuestro modelo de diabetes experimental, se acompaña de un aumento significativo de la infiltración de neutrófilos y en los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-1 β en el tejido hepático en los dos modelos de diabetes (corto y largo plazo). Diversos autores han descrito la relación entre el Factor Nuclear κ B y la producción de mediadores inflamatorios entre los que se encuentran TNF- α , IL-6 y IL-1 β (333).

Por tanto el estrés oxidativo asociado a la diabetes puede ser el detonante de la activación de cascadas de señalización pro-inflamatorias, entre las que se encuentra el Factor Nuclear κ B. La activación de NF- κ B en hígado se hace evidente a los 12 días del diagnóstico de la enfermedad y se acompaña de un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6 y IL-1 β . Sin embargo, la expresión de dos de las proteínas reguladas por este factor y relacionadas con las complicaciones asociadas a la enfermedad, iNOS y COX-2, es únicamente evidente en el modelo de diabetes a largo plazo (28 días).

4.- MECANISMOS DE GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES EN LA DIABETES. PAPEL DE LA XANTINA OXIDASA.

Como hemos comentado en este apartado de la tesis, muchos autores han demostrado que durante la diabetes se produce un estrés oxidativo (334-336). La mayoría de los trabajos se han centrado en el estrés oxidativo producido por la auto-oxidación de la glucosa o en el daño producido por la glicosilación no enzimática de las proteínas. Así por ejemplo, se ha observado que la lipoperoxidación en eritrocitos humanos se correlaciona directamente con los niveles de hemoglobina glicosilada en personas diabéticas (283). Es más, se ha visto que la incubación de eritrocitos humanos en un medio hiperglucémico produce un aumento de la peroxidación y un aumento de la fragilidad osmótica (283). También se ha demostrado que la preincubación de segmentos aórticos con hemoglobina glicosilada produce alteraciones en el endotelio que repercuten sobre el tono vascular (337). En células endoteliales humanas en cultivo se ha observado que los niveles elevados de glucosa producen una inducción de las enzimas antioxidantes, posiblemente debido a un mecanismo de adaptación (190). Todos estos datos nos indican que la hiperglucemia produce estrés oxidativo. Pese a ello, la variación durante el proceso diabético de otros mecanismos de producción de radicales libres en sistemas biológicos no ha sido estudiada en profundidad. Como hemos comentado en el apartado de introducción, la principal fuente de radicales libres en el organismo es la mitocondria (146). Es por este motivo que nuestro grupo de investigación decidió estudiar el papel de la mitocondria en el estrés oxidativo asociado a la diabetes. Con este fin, fueron aisladas mitocondrias de diversos tejidos (hígado, riñón y corazón) de ratas diabetizadas con estreptozotocina y, por técnicas de citometría de

flujo, se determinó el potencial de membrana y la producción de peróxidos intramitocondriales. Como resultado de estos experimentos no se observó ninguna diferencia en ninguno de los tejidos estudiados, en cuanto a la producción de peróxidos por la mitocondria aislada en animales diabéticos (221). Tan sólo se detectó un aumento del potencial de membrana en las mitocondrias aisladas de hígado de rata diabética lo que se explicaría teniendo en cuenta que este órgano, durante la patología, es “hiperfuncionante”. En este sentido, se ha observado en estudios de microscopía electrónica, un aumento muy importante del número de mitocondrias en hígado de ratones diabetizados con estreptozotocina, siendo la estructura de estas mitocondrias aparentemente normal (338). Por tanto, podemos afirmar que la mitocondria no está implicada en la producción de estrés oxidativo en nuestro modelo experimental de diabetes.

En el apartado de Introducción hemos comentado que otra fuente importante de radicales libres en medios biológicos es la reacción catalizada por la xantina oxidasa (221) (339). Para evaluar el papel de esta fuente en primer lugar determinamos la actividad xantina oxidasa, tanto en plasma como en hígado de ratas diabetizadas con estreptozotocina, en los dos modelos experimentales objeto de estudio. Como podemos observar en el apartado de Resultados, encontramos un incremento significativo en los valores de la enzima tanto en plasma como en hígado de los animales diabéticos.

La xantina oxidasa se ha implicado en el daño oxidativo producido en los modelos de isquemia-reperfusión, tanto en animales de experimentación (340) como en seres humanos (171). El aumento de la actividad xantina oxidasa observado tanto en el hígado como en el plasma de nuestros modelos experimentales de diabetes es de gran relevancia, ya que en determinadas patologías se ha relacionado a la xantina oxidasa con el daño producido a nivel del endotelio (79, 80).

Del mismo modo se ha visto que existe una correlación entre la actividad xantina oxidasa y los valores de hemoglobina glicosilada (341). Se sabe que en las células endoteliales existen unos glicosaminglicanos que son capaces de unir de una forma reversible a la xantina oxidasa (85). Estos glicosaminglicanos son sintetizados por todas las células vasculares y se localizan en el interior de gránulos secretores y en la matriz extracelular (342). Además intervienen en funciones tan importantes como son la adhesión, proliferación y diferenciación celular (80), así como en la internalización de macromoléculas a la célula. La unión de la xantina oxidasa a los glicosaminglicanos es inhibida de una forma competitiva por la heparina (85) (80). La xantina oxidasa unida a los glicosaminglicanos se ha relacionado con alteraciones de las funciones endoteliales en la hipercolesterolemia tanto en animales de experimentación (80), como en seres humanos (343). Por tanto, en nuestro modelo experimental un aumento de la actividad xantina oxidasa en plasma da lugar a un incremento de su actividad unida a los glicosaminglicanos en la pared vascular, con la consiguiente alteración de la función endotelial y daño por un incremento en la producción de radical superóxido (221). Debemos tener en cuenta que el radical superóxido puede inactivar al óxido nítrico, que es el principal agente vasodilatador derivado del endotelio (344), además en esta reacción se forman peroxinitritos, de carácter altamente citotóxico (93). Es más, el óxido nítrico inhibe la adhesión de los neutrófilos a la superficie de los vasos (344).

Por tanto, la xantina oxidasa puede ser la llave que inicie todos los mecanismos fisiopatológicos que den lugar a una alteración en la funcionalidad vascular observada en la diabetes (221). Estos resultados publicados por nuestro grupo de investigación fueron confirmados por un grupo japonés un año más tarde (339). Estos autores encontraron un aumento en la actividad XO en plasma y en la

producción de radical superóxido en ratones diabéticos y su inhibición con la administración de alopurinol.

Nos gustaría señalar, en este apartado de la discusión, que el aumento en la actividad XO en diabetes inducida con estreptozotocina se ha demostrado tanto en cerebro (hipocampo, córtex, cerebelo y médula espinal) (345) como en riñón de animales (346).

4.1. ORIGEN DE LA XANTINA OXIDASA EN LOS MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA.

Una cuestión importante que nos planteamos en trabajos previos en nuestro grupo de investigación es el origen de ese exceso de actividad xantina oxidasa encontrado en el plasma de ratas diabetizadas con estreptozotocina. Como hemos comentado en la sección de resultados en la presente tesis determinamos la actividad xantina oxidasa en hígado en los dos modelos experimentales de diabetes. En ambos casos encontramos un aumento muy significativo en los animales que padecen la enfermedad. Sabemos que los tejidos que más actividad xantina oxidasa y deshidrogenas tienen en la rata son el intestino, seguido por el hígado, el riñón y algo menos, el pulmón (76). Por tanto, una posible fuente del exceso de actividad xantina oxidasa encontrada en el plasma de las ratas diabéticas es el hígado (221).

No debemos descartar, sin embargo, otras fuentes como el intestino, el riñón, el pulmón o el propio endotelio. El endotelio es una fuente de la xantina oxidasa circulante en modelos de isquemia-reperfusión (347). Otra posible fuente de la xantina oxidasa circulante es el intestino. Se sabe que la oclusión de la arteria mesentérica produce un gran incremento en la actividad xantina deshidrogenasa y

oxidasa de sangre extraída de la vena porta (348). Otras posibles fuentes son el riñón y el pulmón, debido a que en patologías renales (349) y en patologías respiratorias (350) se ha observado un aumento de la actividad xantina oxidasa circulante. Sin embargo, en estos dos últimos casos también se ha observado un aumento en suero de actividades enzimáticas marcadoras de lesión hepática, por lo que no debe descartarse al hígado como la fuente de la actividad xantina oxidasa circulante.

4.2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LA ACTIVIDAD XANTINA OXIDASA EN DOS MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL.

Si la actividad xantina oxidasa está implicada en el estrés oxidativo observado en la diabetes, una inhibición de la misma traería consigo una disminución del estrés oxidativo observado en nuestro modelo, así como de las alteraciones hepáticas descritas en la enfermedad (inflamación y necrosis). Por este motivo administramos alopurinol a los dos grupos de animales diabéticos (12 días y 28 días). El alopurinol es un análogo de las bases púricas xantina e hipoxantina que tras ser metabolizado a oxipurinol se une de forma competitiva a la enzima impidiendo su acción sobre los sustratos hipoxantina y xantina (351). El efecto del alopurinol en la reducción de la inducción del daño por radicales libres puede, en parte, ser debida a sus propiedades antioxidantes. De hecho existe cierta controversia en relación al papel del alopurinol como antioxidante directo del radical hidroxilo. Moorhouse y cols. (352) demostraron que el alopurinol y el oxipurinol tienen efectos antioxidantes *in vitro*. Sin embargo en este estudio, la concentración de ambos productos fue superior a 500 μ M.

En un estudio posterior Zimmerman y cols. (237) comprobaron que el alopurinol y el oxipurinol a concentraciones en plasma de 12 y 12.9 μM respectivamente (50 mg/Kg durante 2 días), no mostraban ninguna capacidad antioxidante. Un estudio más reciente demuestra que a dosis mucho más altas (por encima de 100 mg/kg), en modelos *in vivo*, el alopurinol sigue sin mostrar actividad antioxidante alguna (353). En nuestro estudio el alopurinol se administró por vía intraperitoneal en el grupo tratado durante 12 días. Se inyectó una primera dosis (20 mg/Kg en 1ml de DMSO) 30 horas antes del sacrificio y una segunda, 6 horas antes del mismo. La administración de alopurinol en el grupo tratado durante 28 días se realizó en el agua de bebida y a una dosis de 32 mg/kg. Es importante señalar que pese a que el tratamiento con alopurinol durante varios días supone una acumulación gradual del oxipurinol (354), éste último no es tan efectivo como el alopurinol como antioxidante *in vitro* (355) (356). Por todo ello pensamos, que los efectos del tratamiento con alopurinol en nuestro estudio son el resultado de la inhibición de la XO y no una consecuencia de las propiedades antioxidantes del producto.

El tratamiento con alopurinol disminuyó de forma muy significativa la actividad xantina oxidasa, tanto en plasma como en hígado, en los dos modelos de diabetes utilizados en la presente tesis doctoral.

4.3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A DOS MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL.

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la enzima con alopurinol, en el modelo de diabetes experimental a corto plazo (12 días), tiene un efecto protector frente al incremento en la oxidación del glutatión sanguíneo y hepático, frente a los niveles de lipoperóxidos y frente al incremento en el oxisterol 7α -OH en el hígado de los animales diabéticos. Sin embargo los valores de lipoperóxidos no se modifican con el tratamiento con alopurinol en el plasma de estos animales. Ya hemos comentado en las secciones previas de la Discusión que tanto nuestro grupo de investigación, como muchos otros, han encontrado un aumento en los niveles de lipoperóxidos en plasma en animales diabéticos y su prevención, tanto con la administración de alopurinol (221) como con el tratamiento combinado con antioxidantes clásicos (357) (358). Los resultados negativos, en este sentido, nos hacen sospechar de un posible problema en la obtención o procesado de la muestra en estos experimentos. De hecho los valores de MDA del grupo control están muy por encima de los valores fisiológicos de este parámetro.

En el caso del modelo de diabetes experimental a largo plazo (28 días). La inhibición de la enzima con alopurinol no muestra ningún efecto frente al incremento en la oxidación del glutatión sanguíneo y hepático, frente a los niveles de lipoperóxidos en plasma y frente al incremento en el oxisterol 7β -OH en el hígado de los animales diabéticos. Sin embargo los niveles tanto de lipoperóxidos como de proteínas oxidadas en hígado, disminuyen de forma significativa en los animales tratados con alopurinol. Por este motivo consideramos que el mecanismo de formación de radicales libres en

un modelo de diabetes experimental a largo plazo (28 días) no sólo implica la activación de la enzima xantina oxidasa sino que otros mecanismos deben estar implicados.

4.4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL SOBRE LA INFLAMACIÓN Y EL DAÑO HEPÁTICO ASOCIADO A DOS MODELOS DE DIABETES EXPERIMENTAL.

Como hemos comentado en uno de los apartados anteriores de la introducción la diabetes tipo I es una enfermedad autoinmune e inflamatoria de los islotes pancreáticos (322). Diversos e importantes factores pato-fisiológicos en el desarrollo de las complicaciones asociadas a esta enfermedad (hiperglucemia, hiperlipidemia, formación y acumulación de productos de glicación avanzada, estrés oxidativo) y la disminución progresiva y simultánea de los mecanismos de defensa antioxidante pueden desembocar en la activación de NF- κ B (324, 325). Nuestros resultados muestran que la vía de señalización de NF- κ B es activada durante un modelo de diabetes a corto plazo. Esto se traduce en un aumento de los niveles de la subunidad p65 del factor nuclear, en extractos nucleares de hígado en los animales diabéticos durante 12 días. Del mismo modo muestra un descenso en los niveles de I κ B α acompañado por un incremento en la su fosforilación y de la Kinasa, IKK β , en los extractos citosólicos de los animales que padecen la enfermedad. La activación del factor de transcripción provoca un aumento significativo de la infiltración de neutrófilos y en los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-1 β en el tejido hepático. Todas estas modificaciones se previenen de forma significativa con la administración de alopurinol aunque los valores obtenidos, tanto en el caso de las citocinas como en los

niveles de infiltración de neutrófilos, no alcanzan a disminuir hasta igualar los del grupo control. El proceso inflamatorio iniciado con la activación de la cascada de señalización del factor nuclear κ B desemboca en un aumento significativo de marcadores de daños hepático como es la actividad ALT plasmática. La administración de alopurinol muestra ser efectiva en la prevención del aumento de este marcador aunque, de nuevo, el tratamiento no supone una disminución suficiente como para alcanzar los valores del grupo control de la transaminasa. En diversos trabajos recientes se ha demostrado que la administración de alopurinol a una dosis muy similar a la utilizada en la presente tesis (10, 25 y 50 mg/kg) muestra ser efectiva en la prevención del daño hepático asociado a la inyección intraperitoneal de D-galactosamina y LPS (359) (360). Del mismo modo nuestro grupo de investigación ha demostrado que la inhibición de la xantina oxidasa con alopurinol (32mg/kg de peso) disminuye la activación del Factor Nuclear κ B en músculo esquelético de animales sometidos a un protocolo de ejercicio físico agotador (361). La administración de alopurinol se acompañó de una disminución en los valores de CK y GOT en plasma tanto en animales como en seres humanos (362) y de distintos parámetros de estrés oxidativo sanguíneos y musculares (20, 361).

Quisimos también determinar el efecto de la administración de alopurinol sobre la necrosis hepática utilizando tinción de hematoxilina-eosina. El hígado proveniente de los animales control estaba constituido por cordones de hepatocitos armónicamente distribuidos entre las vías vasculares de ingreso (espacio portal) y de salida (vénula hepática terminal). Los hígados de los animales con diabetes, inducida con el tratamiento con estreptozotocina durante 12 días, presentaban evidentes signos de daño consistentes en extensas áreas necróticas. Sin embargo, estas alteraciones disminuyen en el

grupo experimental tratado con alopurinol. Los efectos beneficiosos de la administración de alopurinol sobre los distintos modelos de daño hepático se conocen desde hace tiempo (363) (364).

Por último estudiamos la expresión de dos genes regulados por el Factor Nuclear κ B y relacionados con la complicaciones asociadas a la diabetes: iNOS y COX-2. Ambas aumentaron de forma significativa en el hígado de los animales diabéticos durante 28 días. La administración de alopurinol previno dicho incremento en el caso de iNOS, mientras que en el caso de la COX-2 los valores de expresión de la enzima, pese a que disminuyen, no lo hace hasta valores cercanos al reposo. En este sentido, aunque en un modelo experimental distinto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración de alopurinol inhibe la expresión de 3 enzimas reguladas por el factor de transcripción NF- κ B: iNOS, eNOS y MnSOD (361).

Siguiendo con el modelo de diabetes a largo plazo en la presente tesis doctoral hemos encontrado que la administración de alopurinol no previene el aumento significativo de la infiltración de neutrófilos y en los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-1 β en el tejido hepático.

Como conclusión, podemos afirmar que existe una relación entre diabetes e inflamación, y que la actividad xantina oxidasa está implicada en este proceso. La administración de alopurinol puede tener un efecto positivo en la prevención de las complicaciones relacionadas con la enfermedad, especialmente en las fases iniciales de la misma. Sin embargo y dado que en modelos más a largo plazo (28 días) otras fuentes de radicales libres están implicadas en la progresión de las complicaciones del diabético, en estos casos la administración de alopurinol no se muestra tan efectiva (Ver Figura V.1)

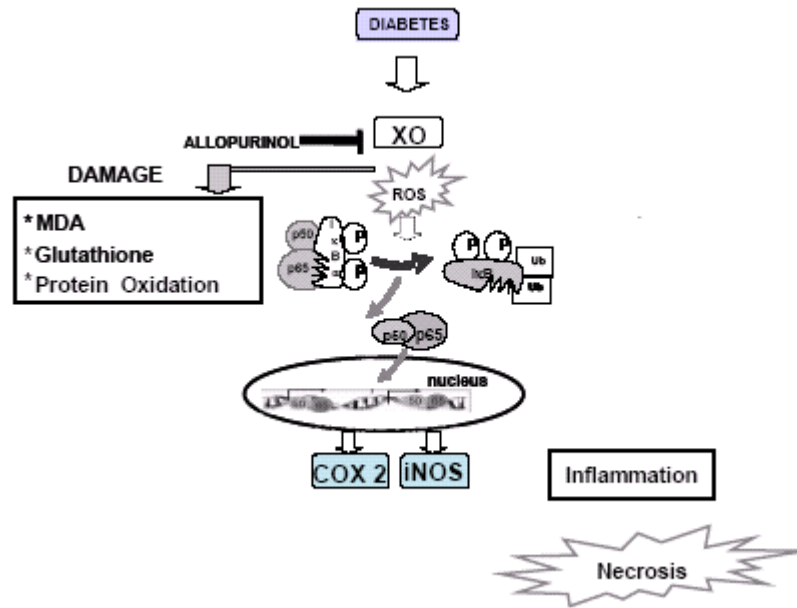


Figura V.1. Modelo propuesto del papel de los radicales libres derivados de la xantina oxidasa en el daño hepático en animales diabéticos.

4.5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ALOPURINOL Y OTROS ANTIOXIDANTES SOBRE LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA DIABETES Y LOS PARÁMETROS DIAGNÓSTICOS DE LA ENFERMEDAD.

El tratamiento con antioxidantes, tanto en modelos animales como en humanos, ha sido objeto de amplio estudio por diversos grupos de investigación. Se sabe que unos niveles disminuidos de vitamina E en plasma multiplica por 3.9 el riesgo de desarrollar una diabetes tipo II, aunque se mantengan constantes otros factores de riesgo como los niveles de LDL, triacilglicéridos, o el colesterol en plasma (365). También se ha demostrado que la administración de antioxidantes como el glutatión o la vitamina E mejoran el efecto de la insulina en diabéticos tipo II (201), y que la administración de vitamina E disminuye significativamente los niveles de hemoglobina glicosilada y de triacilglicéridos en diabéticos tipo I (366). Se ha probado asimismo, que la administración de un combinación de ácido fólico y vitamina E en ratas diabéticas disminuye el riesgo de malformaciones fetales (367).

Diversos antioxidantes han demostrado ser potentes inhibidores del estrés oxidativo asociado a la diabetes. En este sentido las vitamina C y E se han propuesto como terapias antioxidantes efectivas en diversos modelos animales de diabetes. En general la combinación de ambas o su administración individual han mostrado ser efectiva el control de distintos parámetros de estrés oxidativo tales como la lipoperoxidación, isopropanos, niveles plasmáticos de MDA y oxidación de glutatión (357, 358). Estudios de corta duración con la administración de vitaminas E y C han demostrado que la terapia antioxidantes es efectiva en la prevención de la progresión de las complicaciones asociadas a la diabetes (368) (369), así como en la

mejora en la resistencia a la insulina y la sensibilidad a la insulina en paciente con diabetes (370). Sin embargo ensayos clínicos de larga duración no confirman estos resultados (371) (372, 373). De hecho un estudio reciente en el que se evaluó el efecto de la administración de vitamina E en pacientes con distintas patologías demuestra que la suplementación con elevadas dosis de la vitamina (mayores de 400 UI/día) aumenta la mortalidad (374). Se han ofrecido distintas teorías a la hora de explicar esto resultados contradictorios. En primer lugar en esto ensayos no seleccionaron a los pacientes en base a los valores de distintos marcadores de estrés oxidativo. Es probable que los posibles efectos beneficiosos de las terapias antioxidantes se diluyan en el caso de sujetos que carecen o presentan valores muy bajos de estrés oxidativo (375) (376). En segundo lugar existen evidencias de que las vitaminas C y E no sólo muestran ser inefectivas en la disminución de marcadores biológicos de estrés oxidativo (377, 378), sino que pueden actuar incluso como pro-oxidantes (379, 380).

Con respecto al uso otros tipos de antioxidantes, la administración de quercetina y ácido lipoico (329) también han demostrado ser efectivas en el tratamiento de la enfermedad. En este sentido y, en un trabajo publicado en “Diabetología” en 1999, se demostró la activación del factor de transcripción NF- κ B, en células mononucleares sanguíneas de pacientes diabéticos, y que ésta correlaciona con el grado de neuropatía diabética mostrada por el paciente. La activación de NF- κ B se consideró dependiente de estrés oxidativo ya que la suplementación con ácido lipoico redujo su actividad (325). Los mismo autores una año antes habían demostrado la existencia de una correlación entre los índices glucémicos de pacientes diabéticos tipo I y la activación del factor de transcripción NF- κ B en células mononucleares sanguíneas de dichos pacientes

(324). En este caso, de nuevo, la administración de ácido lipoico demostró ser efectiva en la inactivación del factor de transcripción.

Por otra parte recientemente se ha demostrado que la administración de resveratrol, en animales diabéticos, disminuye algunos de los síntomas de la enfermedad tales como pérdida de peso, polidipsia y polifagia. Del mismo modo estos autores demostraron que administración de este antioxidante estimula la captación de glucosa por los hepatocitos, los adipocitos, el músculo esquelético y favorece la síntesis hepática de glucógeno (381).

Otro de los antioxidantes utilizados es el AGI-1067, un fármaco de alta afinidad vascular y lipofílica con potentes propiedades antioxidantes similares a las del probucol (382) y que actualmente se encuentra en estudios fase III (383). Otros importantes fármacos actualmente en uso que han demostrado ser efectivos en la reducción de la mortalidad cardiovascular, en distintos tipos de pacientes, también se sabe que son antioxidantes. En este sentido inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y las estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) han mostrado ser efectivos en pacientes diabéticos y en ensayos clínicos randomizados de larga duración. (384).

En nuestro modelo experimental, sin embargo, la administración de alopurinol no modifica los criterios diagnósticos de la enfermedad: glucosuria o hemoglobina glicosilada, en ninguno de los modelos utilizados (corto y largo plazo). El grado de glicación de la hemoglobina es un reflejo del promedio de glucemia durante el intervalo de tiempo que dura la vida de la hemoglobina, que es como decir la del eritrocito, a saber, unos 120 días. Nosotros consideramos que la ausencia de diferencias en los valores de hemoglobina glicosilada entre los distintos grupos experimentales pueden ser explicadas por las características de los modelos experimentales.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente tesis y, los publicados por otros grupos de investigación, consideramos que la administración de antioxidantes y más concretamente de alopurinol puede tener un efecto positivo en la prevención de las complicaciones relacionadas con el estrés oxidativo en la diabetes experimental inducida con estreptozotocina, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad.

VI-CONCLUSIONES

VI.-CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1.- El mecanismo de formación de radicales libres en un modelo de diabetes experimental a corto plazo (12 días) implica la activación de la xantina oxidasa. La inhibición de la enzima con alopurinol tiene un efecto protector frente al incremento en la oxidación del glutatión sanguíneo y hepático, frente a los niveles de lipoperóxidos y frente al incremento en los oxisteroles en el hígado de los animales diabéticos.

2.- El mecanismo de formación de radicales libres en un modelo de diabetes experimental a largo plazo (28 días) no sólo implica la activación de la enzima xantina oxidasa. Otros mecanismos deben estar implicados.

3.- La diabetes inducida con estreptozotocina provoca un aumento en el marcador de daño hepático alanina aminotransferasa en plasma, y en las áreas de necrosis determinadas mediante tinción con hematoxilina-eosina. La administración de alopurinol previene ambas alteraciones.

4.- La administración de alopurinol no modifica los criterios diagnósticos de la enfermedad: glucosuria o hemoglobina glicosilada, en ninguno de los modelos utilizados (corto y largo plazo).

5.- La vía de señalización de NF- κ B se activa en la diabetes experimental. La administración de alopurinol previene la activación de la cascada de señalización de NF- κ B.

6.- La administración de alopurinol previene la expresión génica asociada a la activación del factor de transcripción NF- κ B. Los niveles citosólicos de iNOS y COX-2 aumentan de forma significativa en el hígado de los animales diabéticos. La administración de alopurinol previene dicho incremento de forma significativa.

7.- La diabetes inducida con estreptozotocina provoca un aumento significativo de la infiltración de neutrófilos y en los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-1 β en el tejido hepático. Estas modificaciones se previenen de forma significativa con la administración de alopurinol únicamente en el modelo a corto plazo.

8.- La administración de alopurinol puede tener un efecto positivo en la prevención de las complicaciones relacionadas con el estrés oxidativo en la diabetes experimental inducida con estreptozotocina, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad.

VII-CONCLUSIONI

VII. -CONCLUSIONI

Una accurata valutazione dei risultati ottenuti ha reso possibile giungere alle seguenti conclusioni:

- 1.** Il meccanismo di formazione dei radicali liberi in un modello di diabete sperimentale a breve termine (12 giorni) implica l'attivazione dell'enzima xantina ossidasi. L'inibizione dell'enzima con allopurinolo ha un effetto protettore sull'incremento dell'ossidazione del glutatione ematico ed epatico. Inoltre questo fenomeno porta a una diminuzione dell'incremento dei livelli di contenuto di lipoperossidi e degli ossisteroli nel fegato degli animali diabetici.
- 2.** Il meccanismo di formazione dei radicali liberi in un modello di diabete sperimentale a lungo termine (28 giorni) implica l'attivazione dell'enzima xantina ossidasi. Si suppone che anche altri meccanismi siano coinvolti.
- 3.** Il diabete indotto con streptozotocina provoca un aumento di alanina aminotransferasi nel plasma, *marker* di danno epatico, e la formazione di aree di necrosi, determinate per colorazione istochimica con ematoxilina-eosina. La somministrazione di allopurinolo previene entrambe le alterazioni.
- 4.** La somministrazione di allopurinolo non modifica i criteri diagnostici della patologia - glicosuria ed emoglobina

glicosilata – nei due modelli utilizzati (a breve e lungo termine).

5. La via di segnalazione di NF- κ B si attiva nel diabete sperimentale. La somministrazione di allopurinolo interviene nella cascata di trasduzione del segnale prevenendo l'attivazione di NF- κ B.

6. La somministrazione di allopurinolo previene l'espressione genica associata all'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B. I livelli citosolici di iNOS e COX-2 aumentano in maniera significativa nel fegato degli animali diabetici. La somministrazione di allopurinolo previene detto incremento in maniera significativa.

7. Il diabete indotto con streptozotocina provoca un aumento significativo dell'infiltrazione dei neutrofilo e dei livelli delle citochine pro-infiammatorie IL-6 e IL-1 β nel tessuto epatico. La somministrazione di allopurinolo protegge in maniera significativa da entrambi i fenomeni unicamente nel modello a breve termine.

8. La somministrazione di allopurinolo può avere un effetto positivo nella prevenzione delle complicazioni associate allo stress ossidativo nel diabete sperimentale indotto per streptozotocina, specialmente nelle fasi iniziali della patologia.

VIII-BIBLIOGRAFÍA

VIII. -BIBLIOGRAFÍA

1. Deckert, T., Poulsen, J. E., and Larsen, M. (1978) Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. I. Survival, causes of death, and complications. *Diabetologia* 14, 363-370
2. Harrison, T. R., and Stone, R. M. (1998) *Harrison's principles of internal medicine pretest self assessment and review*, McGraw-Hill, New York ; London
3. Ernster, L., Atallah, A. S., and Hochstein, P. (1986) DT diaphorase and the cytotoxicity and mutagenicity of quinone-derived oxygen radicals. *Prog Clin Biol Res* 209A, 353-363
4. Pryor, W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48, 657-667
5. Halliwell, B. (1989) Mechanism of action of ibuprofen. In *Ibuprofen - where next?: clinical and pharmacological application of higher dosage schedules* (Hazleman, B., ed) pp. 20-23, Royal Society of Medicine, Duxford
6. Sies, H. (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research* 299, 183
7. Halliwell, B. (1996) Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions* 24, 1023-1027
8. Cross, A. J., Slater, P., Simpson, M., Royston, C., Deakin, J. F., Perry, R. H., and Perry, E. K. (1987) Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurosci Lett* 79, 213-217
9. Okamoto, H. (1985) Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans. *Bioassays* 2, 15-21
10. Reardon, W., Ross, R. J., Sweeney, M. G., Luxon, L. M., Pembrey, M. E., Harding, A. E., and Trembath, R. C. (1992) Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet* 340, 1376-1379.

11. Gerbitz, K. D. (1992) Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? *Diabetologia* 35, 1181-1186.
12. Byers, T. (1993) Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutr. Rev.* 51, 333-345
13. Wolf, S. P., Gamer, A., and Dean, R. T. (1986) Free radicals, lipids and protein degeneration. *Trends Bioch. Sci.* 11, 27-31
14. Slade, R., Crissman, K., Norwood, J., and Hatch, G. (1993) Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp. Lung. Res.* 19, 469-484
15. Tenenbein, M., Kowalski, S., Sienko, A., Bowden, D. H., and Adamson, I. Y. (1992) Pulmonary toxic effects of continuous desferrioxamine administration in acute iron poisoning. *Lancet* 339, 699-701
16. Bondy, S. C. (1992) Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicology* 13, 87-100
17. Pacifi, R. E., and Davies, K. J. (1991) Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised. *Gerontology* 37, 166-180
18. Helain, M. A. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports* 25, 218-224
19. Sastre, J., Asensi, M., Gasco, E., Pallardo, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., and Vina, J. (1992) Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 263, R992-995
20. Gomez-Cabrera, M. C., Martinez, A., Santangelo, G., Pallardo, F. V., Sastre, J., and Vina, J. (2006) Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1, S31-33
21. Asensi, M., Sastre, J., Pallardo, F. V., Garcia de la Asuncion, J., Estrela, J. M., and Vina, J. (1994) A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical Biochemistry* 217, 323-328
22. Pryor, W. A., Squadrito, G. L., and Friedman, M. (1995) A new mechanism for the toxicity of ozone. *Toxicol Lett* 82-83, 287-293.

23. Rock, C. L., Jacob, R. A., and Bowen, P. E. (1996) Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* 96, 693-702; quiz 703-694.
24. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7915-7922
25. Korycka-Dahi, M., and Richardson, T. (1981) Initiation of oxidative changes in food. Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy Sciences.* 63, 1181-1208
26. Freeman, B. A., and Crapo, J. (1982) Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426
27. Frei, B. (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.* 97, 5S-13S
28. Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14S-22S
29. Behar, D., Czapski, G., Rabami, J., Dorfman, L. M., and Schwarz, H. A. (1979) The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical. *J. Phys.Chem.* 74, 3209-3215
30. Grisham, M. B., Jour'd'Heuil, D., and Wink, D. A. (1999) Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276, G315-321
31. Viña, J., Sáez, G. T., Wiggins, D., Roberts, A. F. C., Hems, R., and Krebs, H. A. (1983) The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 212, 39-44.
32. Saez, G., Thornalley, P. J., Hill, H. A., Hems, R., and Bannister, J. V. (1982) The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 719, 24-31
33. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630
34. Fridovich, I. (1986) Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. *Free radicals in biology.* 1. Pryor W.A. (ed) New York, Academic Press, 239-246
35. Romero, F. J., and Cadenas, E. (1987) Hydroperoxide metabolism in vitamin E-deficient hepatocytes. Studies on

- low-level chemiluminescence, lipid peroxidation, and glutathione status. *Pharmacol Ther* 33, 179-186
36. Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992) Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* 17, 221-237
 37. Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-179
 38. Sen, C. K., and Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 10, 709-720.
 39. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1994) The role of O₂⁻ in the production of HO₂·: *In vitro* and *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.* 16, 29-33
 40. Haber, F., and Weiss, J. (1934) The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London.* 147, 332-351
 41. Fenton, H. J. H. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899-910
 42. Kanofsky, J. R. (1989) Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact* 70, 1-28
 43. Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142
 44. Bush, P. A., González, N. E., Griscavage, J. M., and Ignarro, L. J. (1992) Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185, 960-966
 45. Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., and Snyder, S. H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7, 615-624
 46. Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P., and Michel, T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6348-6352

47. Czapski, G., and Goldstein, S. (1995) The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach. *Free. Radic. Biol. Med.* 19, 785-794
48. Lipton, S. A., Chol, Y. B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S. V., Loscalzo, J., Singel, D. L., and Stamler, S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* 364, 626-632
49. Beckman, J. S., Chen, J., Crow, J. P., and Ye, Y. Z. (1994) Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 103, 371-380
50. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-1437
51. Miles, A. M., Bohle, D. S., Glassbrenner, P. A., Hansert, B., Wink, D. A., and Grisham, M. B. (1996) Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem* 271, 40-47
52. Goldstein, J., Paveto, C., Lopez-Costa, J. J., Pereira, C., Alonso, G., Torres, H. N., and Flawia, M. M. (2000) Immuno and cytochemical localization of *Trypanosoma cruzi* nitric oxide synthase. *Biocell* 24, 217-222
53. Granger, D. N., Hollwarth, M. E., and Parks, D. A. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 548, 47-63
54. Postlethwait, E. M., Langford, S. D., Jacobson, L. M., and Bidani, A. (1995) NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med* 19, 553-563
55. Kaur, H., and Halliwell, B. (1994) Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 350, 9-12
56. Doroshov, J. H., and Davies, K. J. (1983) Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin. *Biochem Pharmacol* 32, 2935-2939

57. Pryor, W. A. (1992) Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 13, 659-676
58. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. M. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 248-257
59. Benzi, G., and Moretti, A. (1995) Age and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 77-101
60. Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617-630
61. Boveris, A., and Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54, 311-314
62. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514
63. Rawley, D. A., and Halliwell, B. (1983) Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease. *Clin. Sci.* 64, 649-653.
64. Sawyer, D. T. (1988) The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , $O^{\cdot-}$, $\cdot OH$, and OH^-) in water and aprotic solvents. In *Oxygen radicals in biology and medicine*. (Simic, M. G., Taylor, K. A., Ward, J. F., and Sonntag, C., eds) pp. 11-20, Ed. Plenum Press., New York
65. Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1996) The impact of oxidative stress on eukaryotic iron metabolism. *EXS.* 77, 183-197
66. Capdevila, J., Chacos, N., Werringloer, J., Prough, R. A., and Estabrook, R. W. (1981) Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5362-5366.

67. Chignell, A. H., Crick, M. D., and Markham, R. H. (1979) Retinal detachment surgery without cryotherapy. *Mod Probl Ophthalmol* 20, 214-218
68. Boveris, A., Erecinska, M., and Wagner, M. (1972) Reduction kinetics of cytochromes b. *Biochim Biophys Acta* 256, 223-242.
69. White, M. J., and Heckler, F. R. (1990) Oxygen free radicals and wound healing. *Clin Plast Surg* 17, 473-484
70. Aleman, V., and Handler, P. (1967) Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties. *J Biol Chem* 242, 4087-4096
71. Massey, V., Komai, H., Palmer, G., and Elion, G. B. (1970) On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J Biol Chem* 245, 2837-2844.
72. Babior, B. M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298, 659-668
73. Saksela, M., and Raivio, K. O. (1996) Cloning and expression in vitro of human xanthine dehydrogenase/oxidase. *Biochem J* 315 (Pt 1), 235-239
74. Della Corte, E., and Stirpe, F. (1968) The regulation of rat-liver xanthine oxidase: Activation by proteolytic enzymes. *FEBS Lett* 2, 83-84
75. McCord, J. M., and Roy, R. S. (1982) The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 60, 1346-1352
76. Parks, D. A., and Granger, D. N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 548, 87-99
77. Friedel, H. A., Goa, K. L., and Benfield, P. (1989) S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs* 38, 389-416
78. Granger, D. N., Rutili, G., and McCord, J. M. (1981) Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81, 22-29
79. Terada, L. S., Dormish, J. J., Shanley, P. F., Leff, J. A., Anderson, B. O., and Repine, J. E. (1992) Circulating xanthine

- oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 263, L394-401
80. White, C. R., Darley-Usmar, V., Berrington, W. R., McAdams, M., Gore, J. Z., Thompson, J. A., Parks, D. A., Tarpey, M. M., and Freeman, B. A. (1996) Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8745-8749
 81. Auscher, C., Amory, N., Pasquier, C., and Delbarre, F. (1977) Localization of xanthine oxidase activity in hepatic tissue. A new histochemical method. *Adv Exp Med Biol* 76A, 605-609
 82. Ibrahim, B., and Stoward, P. J. (1978) The histochemical localization of xanthine oxidase. *Histochem J* 10, 615-617
 83. Rouquette, M., Page, S., Bryant, R., Benboubetra, M., Stevens, C. R., Blake, D. R., Whish, W. D., Harrison, R., and Tosh, D. (1998) Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett* 426, 397-401
 84. Tan, S., Yokoyama, Y., Dickens, E., Cash, T. G., Freeman, B. A., and Parks, D. A. (1993) Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 15, 407-414
 85. Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y., and Hirano, K. (1993) Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J* 289 (Pt 2), 523-527
 86. Harrison, R., Benboubetra, M., Bryson, S., Thomas, R. D., and Elwood, P. C. (1990) Antibodies to xanthine oxidase: elevated levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardioscience* 1, 183-189
 87. Bruder, G., Jarasch, E. D., and Heid, H. W. (1984) High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. Molecular characterization. *J Clin Invest* 74, 783-794
 88. Benboubetra, M., Gleeson, A., Harris, C. P., Khan, J., Arrar, L., Brennan, D., Reid, J., Reckless, J. D., and Harrison, R. (1997) Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *Eur J Clin Invest* 27, 611-619

89. Brownlee, M. (1992) Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15, 1835-1843
90. Mullarkey, C. J., Edelstein, D., and Brownlee, M. (1990) Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 932-939
91. Hunt, J. V., Dean, R. T., and Wolff, S. P. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256, 205-212
92. Moncada, S., and Higgs, E. A. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J* 9, 1319-1330
93. Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18, 195-199
94. Stadtman, E. R., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Carney, J. M., and Floyd, R. A. (1992) Protein modification in aging. In (Emerit, I., and Chance, B., eds) pp. 64-72, Virkhäuser Verlag. (Suiza). Basel
95. Davies, K. J. A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901
96. Fucci, L., Oliver, C. N., Coon, M. J., and Stadtman, E. R. (1983) Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 1521-1525
97. Amici, A., Levine, R. L., Tsai, L., and Stadtman, E. R. (1989) Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 264, 3341-3346
98. Dean, R. T., Gieseg, S., and Davies, M. J. (1993) Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci* 18, 437-441
99. Rivett, A. J. (1985) The effect of mixed-function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 624-632

100. Davies, K. J., and Lin, S. W. (1988) Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med* 5, 225-236
101. Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344, 721-724
102. Cheeseman, K. H., and Slater, T. F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49, 588-603
103. Lippman, R. D. (1985) Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.* 20, 1-5
104. Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., and Ames, B. N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10771-10778
105. Albertini, R., Rindi, S., Passi, A., Bardoni, A., Salvini, R., Pallavicini, G., and De Luca, G. (1996) The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 207-214
106. Beseme, F., Astruc, M. E., Defay, R., and Crastes de Paulet, A. (1987) Rat liver cytosol oxysterol-binding protein. Characterization and comparison with the HTC cell protein. *FEBS Lett* 210, 97-103
107. Smith, C. V., Jones, D. P., Guenther, T. M., Lash, L. H., and Lauterburg, B. H. (1996) Compartmentation of glutathione: Implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 1-12.
108. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Laughton, M. J., Quinlan, G. J., and Gutteridge, J. M. (1989) The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 258, 617-620
109. Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52, 253-265
110. Smith, J. L., Lear, S. R., and Erickson, S. K. (1995) Developmental expression of elements of hepatic cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* 36, 641-652
111. Borel, P., Grolier, P., Boirie, Y., Simonet, L., Verdier, E., Rochette, Y., Alexandre-Gouabau, M. C., Beaufriere, B., Lairon, D., and Azais-Braesco, V. (1998) Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to

- carotenoid status in healthy subjects. *J Lab Clin Med* 132, 61-66
112. Greenwald, R. A., and Moy, W. W. (1980) Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23, 455-463
 113. Grootveld, M., Henderson, E. B., Farrell, A., Blake, D. R., Parkes, H. G., and Haycock, P. (1991) Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem. J.* 273, 459-467
 114. McCord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163
 115. Wolff, S. P., and Dean, R. T. (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245, 243-250.
 116. Vicent, G. P., Nacht, A. S., Smith, C. L., Peterson, C. L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004) DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16, 439-452
 117. Kasai, H., and Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxy guanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide and ferric ion. *Gann* 75, 565-566.
 118. Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A. (1992) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-434
 119. Halliwell, B., and Auroma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19
 120. Breen, A. P., and Murphy, J. A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 1033-1077
 121. Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* 25, 1058-1071
 122. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605
 123. Phung, C. D., Ezieme, J. A., and Turrens, J. F. (1994) Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 315, 479-482

124. Sies, H. (1983) Biochemistry of oxidative stress. In *Glutathione: storage, transport and turnover in mammals*. (Y., S., Higashi, T., and Tateishi, N., eds) pp. 63-69., Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.
125. Jocelyn, P. C. (1972) In *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London
126. Richman, P., and Meister, A. (1975) Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 1422-1426.
127. Tateishi, N., Shiozaki, H., Nakashima, K., Naruse, A., and Higashi, T. (1977) Rat liver glutathione: Possible role as reservoir of cysteine. *J. Nutr.* 107, 51-58.
128. Viña, J., Hems, R., and Krebs, A. (1978) Maintenance of glutathione levels content in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 170
129. Finkelstein, J. D. (1992) Regulation of methionine metabolism in mammalian liver. In *Methionine metabolism: Molecular mechanisms and clinical implications* (Mato, J. M., Lieber, C., Kaplowitz, N., and Caballero, A., eds) pp. 22-28, C.S.I.C.
130. Meister, A., and Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.
131. Viña, J., Viña, J. R., and Saez, G. T. (1986) Glutathione: metabolism and physiological functions. *Life Chem. Rep.* 4, 1-35
132. Holmgren, A. (1979) Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from Escherichia coli. *J Biol Chem* 254, 3664-3671
133. Orrenius, S., and Moldeus, P. (1984) The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends. Pharmacol. Sci.* 5, 432-435.
134. Kosower, N. S., and Kosower, E. M. (1983) Glutathione and cell membrane thiol status. In *Functions of glutathione*. (Larson, A., Orrenius, S., Holmgren, A., and Mannervik, B., eds) pp. 307-315, Editorial Raven., Nueva York
135. Viña, J. R., Palacín, M., Puentes, I. R., Hernández, R., and Viña, J. (1989) Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *Am. J. Physiol.* 257, E916-E922.

136. Ochoa, S. (1983) Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 325-349.
137. Van Caneghem, P. (1972) Influence of substances with thiol functions and of their reagents on the fragility of lysosomes. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2417.
138. Gilbert, H. F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12086-12091
139. Bellomo, C., Jewel, S. A., Thor, H., and Orrenius, S. (1982) Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 6842-6846.
140. Terrádez, P., Asensi, M., Lasso de la Vega, M. C., Puertes, I. R., Viña, J., and Estrela, J. M. (1993) Depletion of tumor glutathione *in vivo* by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem. J.* 292, 477-483.
141. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055
142. McCord, J. M., Keele, B. B., and Fridovich, Y. (1974) An enzyme based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 41, 35-97
143. Fridovich, I. (1974) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41, 35-97
144. Weisger, R. A., and Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase: organella specificity. *Journal of Biological Chemistry* 248, 3582-3591
145. Yost, F. J., and Fridovich, I. (1973) An iron containing Superoxide dismutase from *E. coli*. *Journal of Biological Chemistry* 248, 2905-2908
146. Boveris, A., and Chance, B. C. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 143, 707-716
147. FLOHÉ, L. (1989) Glutathione: chemical, biochemical, and medical aspects.
148. Mills, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229, 189-197

149. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., and Hoekstra, W. G. (1972) Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. *J Nutr* 102, 689-696
150. Forstrom, J. W., Zakowski, J. J., and Tappel, A. L. (1978) Identification of the catalytic site of the rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*. 17, 2639-2644.
151. Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
152. Maral, J., Puget, K., and Michelson, A. M. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 77, 1525-1535.
153. Bodaness, R. S., and Chan, P. C. (1979) Singlet oxygen reacts with inhibitors of ultraviolet mediated damage to skin: p-aminobenzoic acid and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 87, 1116-1123
154. Machlin, J. M., and Bendich, A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1, 441-445.
155. Meister, A. (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry* 241, 4353-4356
156. Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R. W., Washko, P. W., Dhariwal, K. R., Park, J. B., Lazarev, A., Graumlich, J. F., King, J., and Cantilena, L. R. (1996) Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3704-3709.
157. Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. E., and Drevon, C. A. (1990) Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.* 120, 233-242.
158. Fukuzawa, K., and Gebicki, J. M. (1983) Antioxidation of alpha-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 242-251.
159. McCay, P. B. (1985) Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.* 5, 323-340.
160. Ozawa, T., Hanaki, A., and Matsuo, M. (1983) Reactions of superoxide ion with tocopherols and model compounds:

- correlation between the physiological activities of tocopherols and the concentration of chromanoxyl radicals. *Biochem. Int.* 6, 685-692.
161. Packer, L. (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 1050S-1055S
 162. Burton, G. W., and Ingold, K. V. (1981) Autooxidation of biological molecules: The antioxidant activity of vitamin E and related chain breaking phenolic antioxidants *in vitro*. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6472-6477.
 163. Chow, C. K. (1985) Vitamin E and blood. *World Rev. Nutr. Diet.* 45, 133-166.
 164. Krinsky, N. I. (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Exp. Biol. Med.* 200, 248-254.
 165. Krinsky, N. I. (1989) Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.* 7, 617-635.
 166. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonaght, A. F., Glazer, A. N., and Ames, B. N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 235, 1043-1046.
 167. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., and Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense against oxidant and radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6858-6862.
 168. Becker, B. F. (1991) Towards the physiological function of uric acid. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 615-631.
 169. Cutler, R. G. (1984) Urate and ascorbate: Their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 3, 321-348.
 170. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinatan, V., and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.* 84, 407-412.
 171. Tan, S., Radi, R., Gaudier, F., Evans, R. A., Rivera, A., Kirk, K., and Parks, A. A. (1993) Physiologic levels of uric acid inhibit xanthine oxidase in human plasma. *Pediatric. Res.* 34, 303-307
 172. Mellors, A., and Tappel, A. L. (The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol.) *J. Biol. Chem.* 241:4353

173. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1-8.
174. Gutteridge, J. M. (1983) Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett* 157, 37-40
175. Bird, R. P., and Draper, H. H. (1984) Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol.* 105, 299-305
176. Knight, J. A., Smith, S. E., Kinder, V. E., and Pieper, R. K. (1988) Urinary lipoperoxides quantified by liquid chromatography and determination of reference values for adults. *Clin. Chem.* 34, 1107-1110
177. Wong, S. H., Knight, J. A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., Leach, C. N., Jr., and Sunderman, F. W., Jr. (1987) Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 33, 214-220
178. Dumelin, E. E., and Tappel, A. I. L. (1977) Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids.* 12, 894-900
179. Wispe, J. R., Knight, M., and Roberts, R. (1986) Lipid peroxidation in newborn rabbits: Effects of oxygen, lipid emulsion and vitamin E. *Pediatr Res* 20, 505-510
180. Wispe, J. R., Bell, E. F., and Roberts, R. (1985) Assessment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion. *Pediatr Res* 19, 374-379
181. Kasai, H., Tanooka, H., and Nishimura, S. (1984) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* 75, 1037-1039.
182. Fraga, C. G., Shigenaga, M. K., Park, J. W., Degan, P., and Ames, B. N. (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4533-4537
183. Sznajder, J. I., Fraiman, A., Hall, J. B., Sanders, W., Schmidt, G., Crawford, G., Nahum, A., Factor, P., and Wood, L. D. (1989) Increased hydrogen peroxide in the expired breath of

- patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 96, 606-612
184. Laurent, P., Janoff, A., and Kagan, H. M. (1983) Cigarette smoke blocks crosslinking of elastin in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127, 189-192
185. Weitzman, S. A., Weitberg, A. B., Clark, E. P., and Stossel, T. P. (1985) Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227, 1231-1233
186. Mapp, P. I., Grootveld, M. C., and Blake, D. R. (1995) Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* 51, 419-436
187. Barrowcliffe, I. W., Gray, E., Derry, P. J., and Gutteridge, J. M. C. (1984) Triglyceride-rich lipoproteins are responsible for thrombin generation induced by lipid peroxides. *Throm. Haem.* 52, 7-10
188. Klein, S. M., Cohen, G., Lieber, C. S., and Cederbaum, A. I. (1983) Increased microsomal oxidation of hydroxyl radical scavenging agents and ethanol after chronic consumption of ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 425-432
189. Bhuyan, K. C., and Bhuyan, D. K. (1984) Molecular mechanism of cataractogenesis: III. Toxic metabolites of oxygen as initiators of lipid peroxidation and cataract. *Curr Eye Res* 3, 67-81
190. Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad, P., and Cerutti, P. (1996) High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 45, 471-477
191. Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C. W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S., and Thal, L. J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336, 1216-1222
192. Pace, G. W., and Leaf, C. D. (1995) The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic Biol Med* 19, 523-528
193. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11, 298-300
194. Miquel, J., Lundgren, P. R., and Johnson, J. E. (1978) Spectrophotofluorimetric and electron microscopic study of

- lipofuscin accumulation in the testis of aging mice. *J. Gerontol.* 33, 5-19
195. Oberley, L. W. (1988) Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5, 113-124
196. Baynes, J. W. (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405-412
197. Sagara, M., Satoh, J., Wada, R., Yagihashi, S., Takahashi, K., Fukuzawa, M., Muto, G., Muto, Y., and Toyota, T. (1996) Inhibition of development of peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats with N-acetylcysteine. *Diabetologia* 39, 263-269
198. Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19, 257-267
199. Wolff, S. P. (1993) Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 49, 642-652
200. Forrester, T. E., Badaloo, V., Bennett, F. I., and Jackson, A. A. (1990) Excessive excretion of 5-oxoproline and decreased levels of blood glutathione in type II diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 44, 847-850
201. Paolisso, G., Di Maro, G., Pizza, G., D'Amore, A., Sgambato, S., Tesouro, P., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1992) Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 263, E435-440
202. Lou, M. F., Dickerson, J. E., Jr., Garadi, R., and York, B. M., Jr. (1988) Glutathione depletion in the lens of galactosemic and diabetic rats. *Exp Eye Res* 46, 517-530
203. Bode, A. M., Yavarow, C. R., Fry, D. A., and Vargas, T. (1993) Enzymatic basis for altered ascorbic acid and dehydroascorbic acid levels in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 1347-1353
204. Griesmacher, A., Kindhauser, M., Andert, S. E., Schreiner, W., Toma, C., Knoebl, P., Pietschmann, P., Prager, R., Schnack, C., Schernthaner, G., and et al. (1995) Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 98, 469-475

205. Jeremy, J. Y., Breimer, L. H., Thompson, C. S., and Mikhailidis, D. P. (1991) Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 40, 442-443
206. Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347, 444-445
207. Liang, P., Hughes, V., and Fukagawa, N. K. (1997) Increased prevalence of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of older individuals with impaired glucose tolerance: possible marker of glycemc stress. *Diabetes* 46, 920-923.
208. Wells-Knecht, M. C., Lyons, T. J., McCance, D. R., Thorpe, S. R., and Baynes, J. W. (1997) Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J Clin Invest* 100, 839-846
209. Hunt, J. V., Smith, C. C., and Wolff, S. P. (1990) Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39, 1420-1424
210. Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48, 1-9
211. Wolff, S. P., Bascal, Z. A., and Hunt, J. V. (1989) "Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Prog Clin Biol Res* 304, 259-275
212. Pfeiffer, A., and Schatz, H. (1995) Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103, 7-14
213. Nishigaki, I., Hagihara, M., Tsunekawa, H., Maseki, M., and Yagi, K. (1981) Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med* 25, 373-378
214. Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., McCarthy, S., Betteridge, D. J., and Wolff, S. P. (1995) Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 44, 1054-1058
215. McCance, D. R., Dyer, D. G., Dunn, J. A., Bailie, K. E., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., and Lyons, T. J. (1993) Maillard

- reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91, 2470-2478
216. Cameron, N. E., and Cotter, M. A. (1993) Potential therapeutic approaches to the treatment or prevention of diabetic neuropathy: evidence from experimental studies. *Diabet Med* 10, 593-605
217. Cameron, N. E., and Cotter, M. A. (1997) Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes* 46 Suppl 2, S31-37
218. Whorton, A. R., Montgomery, M. E., and Kent, R. S. (1985) Effect of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 76, 295-302
219. Hinokio, Y., Suzuki, S., Hirai, M., Chiba, M., Hirai, A., and Toyota, T. (1999) Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia* 42, 995-998
220. Kim, S. J., Reiter, R. J., Rouvier Garay, M. V., Qi, W., El-Sokkary, G. H., and Tan, D. X. (1998) 2-Nitropropane-induced lipid peroxidation: antitoxic effects of melatonin. *Toxicology* 130, 183-190
221. Desco, M. C., Asensi, M., Marquez, R., Martinez-Valls, J., Vento, M., Pallardo, F. V., Sastre, J., and Vina, J. (2002) Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 51, 1118-1124
222. Cosic, V., Antic, S., Pesic, M., Jovanovic, O., Kundalic, S., and Djordjevic, V. B. (2001) Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med* 39, 818-821
223. Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Yamakita, J., Takahashi, S., and Higashino, K. (1998) Comparative localization of aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase activity in rat tissues. *Histochem J* 30, 69-74
224. Kurosaki, M., Li Calzi, M., Scanziani, E., Garattini, E., and Terao, M. (1995) Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem J* 306 (Pt 1), 225-234

225. Godber, B. L., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2000) A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett* 475, 93-96
226. Linder, N., Rapola, J., and Raivio, K. O. (1999) Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest* 79, 967-974.
227. Hellsten-Westing, Y. (1993) Immunohistochemical localization of xanthine oxidase in human cardiac and skeletal muscle. *Histochemistry* 100, 215-222.
228. Korthuis, R. J., and Granger, D. N. (1993) Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 16, 119-26
229. Hancock, J. T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M. C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2002) Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3308-3310
230. Kooij, A., Schijns, M., Frederiks, W. M., Van Noorden, C. J., and James, J. (1992) Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues--a histochemical and biochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63, 17-23
231. Jarasch, E. D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., and Franke, W. W. (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 25, 67-82.
232. Battelli, M. G., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici, L., Strocchi, P., Tazzari, P. L., Gramantieri, L., and Stirpe, F. (1999) Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chim Acta* 281, 147-158
233. Battelli, M. G., Musiani, S., Valgimigli, M., Gramantieri, L., Tomassoni, F., Bolondi, L., and Stirpe, F. (2001) Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am J Gastroenterol* 96, 1194-1199
234. Shimada, K., Gill, P. J., Silbert, J. E., Douglas, W. H., and Fanburg, B. L. (1981) Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 68, 995-1002

235. Terada, L. S., Rubinstein, J. D., Lesnefsky, E. J., Horwitz, L. D., Leff, J. A., and Repine, J. E. (1991) Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium. *Am J Physiol* 260, H805-810
236. Grum, C. M., Ragsdale, R. A., Ketai, L. H., and Shlafer, M. (1986) Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 141, 1104-1108
237. Zimmerman, B. J., Parks, D. A., Grisham, M. B., and Granger, D. N. (1988) Allopurinol does not enhance antioxidant properties of extracellular fluid. *Am J Physiol* 255, H202-206
238. Weinbroum, A., Nielsen, V. G., Tan, S., Gelman, S., Matalon, S., Skinner, K. A., Bradley, E., Jr., and Parks, D. A. (1995) Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am J Physiol* 268, G988-996
239. Shamma'a, M. H., Nasrallah, S. M., and al-Khalidi, U. A. (1973) Serum xanthine oxidase. An experience with 2000 patients. *Am J Dig Dis* 18, 15-22
240. Poss, W. B., Huecksteadt, T. P., Panus, P. C., Freeman, B. A., and Hoidal, J. R. (1996) Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am J Physiol* 270, L941-946
241. Radi, R., Rubbo, H., Bush, K., and Freeman, B. A. (1997) Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes. *Arch Biochem Biophys* 339, 125-135
242. Giler, S., Sperling, O., Brosh, S., Urca, I., and De Vries, A. (1975) Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clin Chim Acta* 63, 37-40
243. Harris, C. M., and Massey, V. (1997) The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem* 272, 8370-8379
244. Li, H., Samouilov, A., Liu, X., and Zweier, J. L. (2001) Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in

- nitric oxide generation in anoxic tissues. *J Biol Chem* 276, 24482-24489
245. Hassoun, P. M., Yu, F. S., Shedd, A. L., Zulueta, J. J., Thannickal, V. J., Lanzillo, J. J., and Fanburg, B. L. (1994) Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension. *Am J Physiol* 266, L163-171
246. Terada, L. S., Piermattei, D., Shibao, G. N., McManaman, J. L., and Wright, R. M. (1997) Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels. *Arch Biochem Biophys* 348, 163-168
247. Hassoun, P. M., Yu, F. S., Cote, C. G., Zulueta, J. J., Sawhney, R., Skinner, K. A., Skinner, H. B., Parks, D. A., and Lanzillo, J. J. (1998) Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 299-305
248. Elion, G. B., Kovensky, A., Hitchings, G. H., Metz, E., and Rundless, R. W. (1966) Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 15, 863-880
249. Truglio, J. J., Theis, K., Leimkuhler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K. V., and Kisker, C. (2002) Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Structure* 10, 115-125
250. Ding, A. H., Nathan, C. F., and Stuehr, D. J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141, 2407-2412
251. Maeda, H., Okamoto, T., and Akaike, T. (1998) Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol Chem* 379, 193-200
252. Gonzalez, E., Rosello-Catafau, J., Xaus, C., Jawerbaum, A., Novaro, V., Gomez, G., Gelpi, E., and Gimeno, M. A. (1997) Influence of nitric oxide synthase and kinin antagonists on metabolic parameters in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Prostaglandins* 53, 321-336

253. Gonzalez, E. T., Jawerbaum, A., Novaro, V., and Gimeno, M. A. (1996) Prostanoid modulation of glucose transport in isolated diabetic rat uterus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54, 293-296
254. Gonzalez, E., Rosello-Catafau, J., Jawerbaum, A., Sinner, D., Pustovrh, C., Vela, J., White, V., Xaus, C., Peralta, C., and Gimeno, M. (2000) Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Braz J Med Biol Res* 33, 1335-1342
255. Gonzalez, E., Jawerbaum, A., Sinner, D., Pustovrh, C., Xaus, C., Peralta, C., Gomez, G., Rosello-Catafau, J., Gelpi, E., and Gimeno, M. (1999) Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway. *Nitric Oxide* 3, 459-466
256. Nielsen, B., Hyldig, T., Bidstrup, F., Gonzalez-Alonso, J., and Christoffersen, G. R. (2001) Brain activity and fatigue during prolonged exercise in the heat. *Pflugers Arch* 442, 41-48.
257. Arnush, M., Heitmeier, M. R., Scarim, A. L., Marino, M. H., Manning, P. T., and Corbett, J. A. (1998) IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest* 102, 516-526
258. Eizirik, D. L., Flodstrom, M., Karlens, A. E., and Welsh, N. (1996) The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 39, 875-890
259. Zakula, Z., Koricanac, G., Putnikovic, B., Markovic, L., and Isenovic, E. R. (2007) Regulation of the inducible nitric oxide synthase and sodium pump in type 1 diabetes. *Med Hypotheses*
260. Kimura, C., Oike, M., Watanabe, M., and Ito, Y. (2007) Proapoptotic nitric oxide production in amyloid beta protein-treated cerebral microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 14, 89-97
261. Litherland, S. A., She, J. X., Schatz, D., Fuller, K., Hutson, A. D., Peng, R. H., Li, Y., Grebe, K. M., Whittaker, D. S., Bahjat, K., Hopkins, D., Fang, Q., Spies, P. D., North, K., Wasserfall, C., Cook, R., Dennis, M. A., Crockett, S., Sleasman, J., Kocher, J., Muir, A., Silverstein, J., Atkinson, M., and Clare-Salzler, M. J. (2003) Aberrant monocyte prostaglandin

- synthase 2 (PGS2) expression in type 1 diabetes before and after disease onset. *Pediatr Diabetes* 4, 10-18
262. Litherland, S. A., Xie, T. X., Grebe, K. M., Li, Y., Moldawer, L. L., and Clare-Salzler, M. J. (2004) IL10 resistant PGS2 expression in at-risk/Type 1 diabetic human monocytes. *J Autoimmun* 22, 227-233
263. Cosentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z. S., and Luscher, T. F. (1997) High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 96, 25-28
264. Jain, S. K., McVie, R., Jaramillo, J. J., and Chen, Y. (1998) Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL + VLDL in Type-I diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 24, 175-181
265. Baldwin, A. S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683
266. Sen, R., and Baltimore, D. (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928
267. Liou, H. C., and Baltimore, D. (1993) Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 5, 477-487
268. Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405-455
269. Whiteside, S. T., and Israel, A. (1997) I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8, 75-82
270. Zalcman, S. S., and Siegel, A. (2006) The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines. *Brain Behav Immun* 20, 507-514
271. Clinton, S. K., and Libby, P. (1992) Cytokines and growth factors in atherogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 116, 1292-1300
272. Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W., and Renold, A. E. (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48, 2129-2139
273. Jain, S. K., Levine, S. N., Duett, J., and Hollier, B. (1990) Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Metabolism* 39, 971-975

274. Ozturk, Y., Altan, V. M., and Yildizoglu-Ari, N. (1996) Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev* 48, 69-112
275. Wollenberger, A., Ristau, O., and Schoffa, G. (1960) [A simple technic for extremely rapid freezing of large pieces of tissue.]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 270, 399-412
276. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
277. Blough, E., Dineen, B., and Esser, K. (1999) Extraction of nuclear proteins from striated muscle tissue. *Biotechniques* 26, 202-204, 206
278. Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W., and Potter, D. W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry* 106, 55-62
279. Drabkin, D. L., and Austin, J. H. (1935) Spectrophotometric studies Preparation from washed blood cell; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J. Biol. Chem* 11:51
280. Beckman, J. S., Parks, D. A., Pearson, J. D., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1989) A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med* 6, 607-615
281. Doi, K., Sawada, F., Toda, G., Yamachika, S., Seto, S., Urata, Y., Ihara, Y., Sakata, N., Taniguchi, N., Kondo, T., and Yano, K. (2001) Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Res* 34, 251-261
282. McLennan, S. V., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, D. K., and Turtle, J. R. (1991) Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 40, 344-348
283. Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T. T., Stegink, L. D., Diekus, M., and Oberley, L. (1986) Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 35, 503-507

284. de Cavanagh, E. M., Inserra, F., Toblli, J., Stella, I., Fraga, C. G., and Ferder, L. (2001) Enalapril attenuates oxidative stress in diabetic rats. *Hypertension* 38, 1130-1136
285. Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinato, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., and Boccuzzi, G. (2005) Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* 187, 37-44
286. Jain, S. K., and McVie, R. (1994) Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 43, 306-309
287. Uzel, N., Sivas, A., Uysal, M., and Oz, H. (1987) Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 19, 89-90
288. Wohaieb, S. A., and Godin, D. V. (1987) Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 36, 1014-1018
289. Alpert, A. J., and Gilbert, H. F. (1985) Detection of oxidized and reduced glutathione with a recycling postcolumn reaction. *Anal Biochem* 144, 553-562
290. Jayatilleke, E., and Shaw, S. (1993) A high-performance liquid chromatographic assay for reduced and oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 214, 452-457
291. Sen, C. K., Marin, E., Kretzschmar, M., and Hanninen, O. (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 73, 1265-1272
292. Jain, S. K., McVie, R., Duett, J., and Herbst, J. J. (1989) Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 38, 1539-1543
293. Zhang, W., Khanna, P., Chan, L. L., Campbell, G., and Ansari, N. H. (1997) Diabetes-induced apoptosis in rat kidney. *Biochem Mol Med* 61, 58-62
294. Armstrong, D., and al-Awadi, F. (1991) Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 11, 433-436

295. Low, P. A., and Nickander, K. K. (1991) Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 40, 873-877
296. Climent, I., Tsai, L., and Levine, R. L. (1989) Derivatization of gamma-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal Biochem* 182, 226-232
297. Pognonec, P., Kato, H., and Roeder, R. G. (1992) The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner. *J Biol Chem* 267, 24563-24567
298. Stadman, E. R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224
299. Adkison, D., Hollwarth, M. E., Benoit, J. N., Parks, D. A., McCord, J. M., and Granger, D. N. (1986) Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 548, 101-107
300. Je, H. D., Shin, C. Y., Park, H. S., Huh, I. H., and Sohn, U. D. (2001) The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. *J Auton Pharmacol* 21, 231-236
301. Kayali, R., Cakatay, U., Telci, A., Akcay, T., Sivas, A., and Altug, T. (2004) Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 20, 315-321
302. Kayali, R., Telci, A., Cakatay, U., Karaca, C., Akcay, T., Sivas, A., and Altug, T. (2003) Oxidative protein damage parameters in plasma in chronic experimental diabetes in rats. *Eur J Med Res* 8, 307-312
303. Oliver, C. N., Starke-Reed, P. E., Stadtman, E. R., Liu, G. J., Carney, J. M., and Floyd, R. A. (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5144-5147
304. Nakamura, A., and Goto, S. (1996) Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *J Biochem (Tokyo)* 119, 768-774

305. Portero-Otin, M., Pamplona, R., Ruiz, M. C., Cabisco, E., Prat, J., and Bellmunt, M. J. (1999) Diabetes induces an impairment in the proteolytic activity against oxidized proteins and a heterogeneous effect in nonenzymatic protein modifications in the cytosol of rat liver and kidney. *Diabetes* 48, 2215-2220
306. Miyata, T., Inagi, R., Asahi, K., Yamada, Y., Horie, K., Sakai, H., Uchida, K., and Kurokawa, K. (1998) Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437, 24-28
307. Schroeffer, G. J., Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80, 361-554
308. Biasi, F., Leonarduzzi, G., Vizio, B., Zanetti, D., Sevanian, A., Sottero, B., Verde, V., Zingaro, B., Chiarpotto, E., and Poli, G. (2004) Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *Faseb J* 18, 693-695
309. Leonarduzzi, G., Vizio, B., Sottero, B., Verde, V., Gamba, P., Mascia, C., Chiarpotto, E., Poli, G., and Biasi, F. (2006) Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Antioxid Redox Signal* 8, 375-380
310. Salonen, J. T., Nyssonen, K., Salonen, R., Porkkala-Sarataho, E., Tuomainen, T. P., Diczfalusy, U., and Bjorkhem, I. (1997) Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 95, 840-845
311. Zieden, B., Kaminskas, A., Kristenson, M., Kucinskiene, Z., Vessby, B., Olsson, A. G., and Diczfalusy, U. (1999) Increased plasma 7 beta-hydroxycholesterol concentrations in a population with a high risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 967-971
312. Yoshioka, N., Adachi, J., Ueno, Y., and Yoshida, K. (2005) Oxysterols increase in diabetic rats. *Free Radic Res* 39, 299-304
313. Murakami, H., Tamasawa, N., Matsui, J., Yasujima, M., and Suda, T. (2000) Plasma oxysterols and tocopherol in patients with diabetes mellitus and hyperlipidemia. *Lipids* 35, 333-338

314. Abo, K., Mio, T., and Sumino, K. (2000) Comparative analysis of plasma and erythrocyte 7-ketocholesterol as a marker for oxidative stress in patients with diabetes mellitus. *Clin Biochem* 33, 541-547
315. Matsui, H., Okumura, K., Mukawa, H., Hibino, M., Toki, Y., and Ito, T. (1997) Increased oxysterol contents in diabetic rat hearts: their involvement in diabetic cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 13, 373-379
316. Lubec, B., Hermon, M., Hoeger, H., and Lubec, G. (1998) Aromatic hydroxylation in animal models of diabetes mellitus. *Faseb J* 12, 1581-1587
317. Vericel, E., Januel, C., Carreras, M., Moulin, P., and Lagarde, M. (2004) Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 53, 1046-1051
318. Traverso, N., Menini, S., Odetti, P., Pronzato, M. A., Cottalasso, D., and Marinari, U. M. (1999) Lipoperoxidation in hepatic subcellular compartments of diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 26, 538-547
319. Cosso, L., Maineri, E. P., Traverso, N., Rosatto, N., Pronzato, M. A., Cottalasso, D., Marinari, U. M., and Odetti, P. (2001) Induction of heme oxygenase 1 in liver of spontaneously diabetic rats. *Free Radic Res* 34, 189-191
320. Herrman, C. E., Sanders, R. A., Klaunig, J. E., Schwarz, L. R., and Watkins, J. B., 3rd (1999) Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Sci* 50, 146-151
321. Reid, A. E. (2001) Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 121, 710-723
322. Dixon, J. B., Bhathal, P. S., and O'Brien, P. E. (2001) Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 121, 91-100
323. El-Serag, H. B., Richardson, P. A., and Everhart, J. E. (2001) The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am J Gastroenterol* 96, 2462-2467

324. El-Serag, H. B., Tran, T., and Everhart, J. E. (2004) Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 126, 460-468
325. El-Serag, H. B., and Everhart, J. E. (2002) Diabetes increases the risk of acute hepatic failure. *Gastroenterology* 122, 1822-1828
326. Kingston, M. E., Ali, M. A., Atiyeh, M., and Donnelly, R. J. (1984) Diabetes mellitus in chronic active hepatitis and cirrhosis. *Gastroenterology* 87, 688-694
327. Gentile, S., Loguercio, C., Marmo, R., Carbone, L., and Del Vecchio Blanco, C. (1993) Incidence of altered glucose tolerance in liver cirrhosis. *Diabetes Res Clin Pract* 22, 37-44
328. Matz, R. (1972) Diabetes with liver failure. *Lancet* 1, 851-852
329. Acosta, D., and Wenzel, D. G. (1974) Injury produced by free fatty acids to lysosomes and mitochondria in cultured heart muscle and endothelial cells. *Atherosclerosis* 20, 417-426
330. Lamhamedi-Cherradi, S. E., Zheng, S., Hilliard, B. A., Xu, L., Sun, J., Alsheadat, S., Liou, H. C., and Chen, Y. H. (2003) Transcriptional regulation of type I diabetes by NF-kappa B. *J Immunol* 171, 4886-4892
331. Like, A. A., and Rossini, A. A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415-417
332. Hofmann, M. A., Schiekofer, S., Kanitz, M., Klevesath, M. S., Joswig, M., Lee, V., Morcos, M., Tritschler, H., Ziegler, R., Wahl, P., Bierhaus, A., and Nawroth, P. P. (1998) Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 21, 1310-1316
333. Hofmann, M. A., Schiekofer, S., Isermann, B., Kanitz, M., Henkels, M., Joswig, M., Treusch, A., Morcos, M., Weiss, T., Borcea, V., Abdel Khalek, A. K., Amiral, J., Tritschler, H., Ritz, E., Wahl, P., Ziegler, R., Bierhaus, A., and Nawroth, P. P. (1999) Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia* 42, 222-232

334. Liang, Y., Zhou, Y., and Shen, P. (2004) NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* 1, 343-350
335. Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A., and Williams, B. R. (2000) NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 20, 1278-1290
336. Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Klötting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A. M., Stern, D. M., Haring, H. U., Schleicher, E., and Nawroth, P. P. (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50, 2792-2808
337. Dias, A. S., Porawski, M., Alonso, M., Marroni, N., Collado, P. S., and Gonzalez-Gallego, J. (2005) Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 135, 2299-2304
338. Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., and Yamamoto, S. (1995) Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 270, 31315-31320
339. Prabhakar, S. S. (2004) Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 24, 333-344
340. Stadler, K., Jenei, V., von Bolcschazy, G., Somogyi, A., and Jakus, J. (2003) Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic Biol Med* 35, 1240-1251
341. Shoelson, S. E., Lee, J., and Yuan, M. (2003) Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S49-52
342. Yung, L. M., Leung, F. P., Yao, X., Chen, Z. Y., and Huang, Y. (2006) Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 6, 1-19

343. Niedowicz, D. M., and Daleke, D. L. (2005) The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43, 289-330
344. Endemann, D. H., and Schiffrin, E. L. (2004) Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep* 6, 85-89
345. Angulo, J., Sanchez-Ferrer, C. F., Peiro, C., Marin, J., and Rodriguez-Manas, L. (1996) Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin. Possible mechanisms involved. *Hypertension* 28, 583-592
346. Kume, E., Ohmachi, Y., Itagaki, S., Tamura, K., and Doi, K. (1994) Hepatic changes of mice in the subacute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes. *Exp Toxicol Pathol* 46, 368-374
347. Matsumoto, S., Koshiishi, I., Inoguchi, T., Nawata, H., and Utsumi, H. (2003) Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res* 37, 767-772
348. Trewick, A. L., el-Hassan, K., Round, J. M., and Adisesiah, M. (1996) Xanthine oxidase in critically ischaemic and claudicant limbs: profile of activity during early reperfusion. *Br J Surg* 83, 798-802
349. Kuppusamy, U. R., Indran, M., and Rokiah, P. (2005) Glycaemic control in relation to xanthine oxidase and antioxidant indices in Malaysian Type 2 diabetes patients. *Diabet Med* 22, 1343-1346
350. Kjellen, L., and Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-475
351. Cardillo, C., Kilcoyne, C. M., Cannon, R. O., 3rd, Quyyumi, A. A., and Panza, J. A. (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 30, 57-63
352. Moncada, S. (1993) The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 28, 97-99

353. Demirpence, E., Caner, H., Baybek, M., and Kilinc, K. (1999) Antioxidant action of the antiarrhythmic drug mexiletine in brain membranes. *Jpn J Pharmacol* 81, 7-11
354. Oktem, F., Ozguner, F., Yilmaz, H. R., Uz, E., and Dundar, B. (2006) Melatonin reduces urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, albumin and renal oxidative markers in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 95-101
355. Friedl, H. P., Till, G. O., Trentz, O., and Ward, P. A. (1991) Role of oxygen radicals in tourniquet-related ischemia-reperfusion injury of human patients. *Klin Wochenschr* 69, 1109-1112
356. Caty, M. G., Schmeling, D. J., Friedl, H. P., Oldham, K. T., Guice, K. S., and Till, G. O. (1990) Histamine: a promoter of xanthine oxidase activity in intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 25, 218-222; discussion 222-213
357. Laakso, J. T., Teravainen, T. L., Martelin, E., Vaskonen, T., and Lapatto, R. (2004) Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 22, 1333-1340
358. Flaishon, R., Szold, O., and Weinbroum, A. A. (2006) Acute lung injury following pancreas ischaemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Eur J Clin Invest* 36, 831-837
359. Hille, R., and Massey, V. (1981) Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J Biol Chem* 256, 9090-9095
360. Moorhouse, P. C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J. G., and Gutteridge, J. M. (1987) Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 213, 23-28
361. Klein, A. S., Joh, J. W., Rangan, U., Wang, D., and Bulkley, G. B. (1996) Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med* 21, 713-717
362. Murrell, G. A., and Rapeport, W. G. (1986) Clinical pharmacokinetics of allopurinol. *Clin Pharmacokinet* 11, 343-353
363. Das, D. K., Engelman, R. M., Clement, R., Otani, H., Prasad, M. R., and Rao, P. S. (1987) Role of xanthine oxidase inhibitor as free radical scavenger: a novel mechanism of action of allopurinol and oxypurinol in myocardial salvage. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 314-319

364. Smith, J. K., Carden, D. L., and Korthuis, R. J. (1989) Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle. *Am J Physiol* 257, H1782-1789
365. Slatter, D. A., Bolton, C. H., and Bailey, A. J. (2000) The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 43, 550-557
366. Morrow, J. D. (2000) The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 32, 377-385
367. Ohta, Y., Matsura, T., Kitagawa, A., Tokunaga, K., and Yamada, K. (2007) Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species contribute to the development of D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Free Radic Res* 41, 135-144
368. Xiang, L., Klintman, D., and Thorlacius, H. (2003) Allopurinol inhibits CXC chemokine expression and leukocyte adhesion in endotoxemic liver injury. *Inflamm Res* 52, 353-358
369. Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L., and Vina, J. (2005) Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567, 113-120
370. Gomez-Cabrera, M. C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Vina, J., and Garcia-del-Moral, L. (2003) Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Jama* 289, 2503-2504
371. Nordstrom, G., Seeman, T., and Hasselgren, P. O. (1985) Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 97, 679-684
372. Kono, H., Rusyn, I., Bradford, B. U., Connor, H. D., Mason, R. P., and Thurman, R. G. (2000) Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 296-303
373. Salonen, J. T., Nyssonen, K., Tuomainen, T. P., Maenpaa, P. H., Korpela, H., Kaplan, G. A., Lynch, J., Helmrich, S. P., and Salonen, R. (1995) Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *Bmj* 311, 1124-1127
374. Jain, S. K., McVie, R., Jaramillo, J. J., Palmer, M., and Smith, T. (1996) Effect of modest vitamin E supplementation on

- blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 15, 458-461
375. Gareskog, M., Eriksson, U. J., and Wentzel, P. (2006) Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76, 483-490
376. Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafter, U., Iaina, A., Knecht, A., Weissgarten, Y., Brunner, D., Fainaru, M., and Green, M. S. (2000) Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 356, 1213-1218
377. Gaede, P., Poulsen, H. E., Parving, H. H., and Pedersen, O. (2001) Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 18, 756-760
378. Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 599-622
379. Marchioli, R., Schweiger, C., Levantesi, G., Tavazzi, L., and Valagussa, F. (2001) Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids* 36 Suppl, S53-63
380. Lonn, E., Yusuf, S., Hoogwerf, B., Pogue, J., Yi, Q., Zinman, B., Bosch, J., Dagenais, G., Mann, J. F., and Gerstein, H. C. (2002) Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 25, 1919-1927
381. Lee, D. H., Folsom, A. R., Harnack, L., Halliwell, B., and Jacobs, D. R., Jr. (2004) Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? *Am J Clin Nutr* 80, 1194-1200
382. Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., and Guallar, E. (2005) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142, 37-46

383. Violi, F., Loffredo, L., Musella, L., and Marcocchia, A. (2004) Should antioxidant status be considered in interventional trials with antioxidants? *Heart* 90, 598-602
384. Violi, F., Micheletta, F., and Iuliano, L. (2002) How to select patient candidates for antioxidant treatment? *Circulation* 106, e195; author reply e195
385. Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J. A., and FitzGerald, G. A. (1996) Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 94, 19-25
386. Meagher, E. A., Barry, O. P., Burke, A., Lucey, M. R., Lawson, J. A., Rokach, J., and FitzGerald, G. A. (1999) Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest* 104, 805-813
387. McGregor, G. (2004) Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note. *Med Hypotheses* 62, 641-642
388. Upston, J. M., Terentis, A. C., Morris, K., Keaney Jr, J. F., and Stocker, R. (2002) Oxidized lipid accumulates in the presence of alpha-tocopherol in atherosclerosis. *Biochem J* 363, 753-760
389. Su, H. C., Hung, L. M., and Chen, J. K. (2006) Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E1339-1346
390. Tardif, J. C. (2003) Clinical results with AGI-1067: a novel antioxidant vascular protectant. *Am J Cardiol* 91, 41A-49A
391. Jay, D., Hitomi, H., and Griendling, K. K. (2006) Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 40, 183-192
392. Collins, R., Armitage, J., Parish, S., Sleight, P., and Peto, R. (2003) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 2005-2016