

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación del estrés oxidativo en fibrosis pulmonar inducida experimentalmente por talco: papel de la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol**

FRANCISCO JOSÉ ROMÁN PÉREZ  
2005





DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DON JESÚS RODRÍGUEZ HUERTAS**, Profesor Titular del  
Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designa la Facultad de Medicina de Granada, **DON FRANCISCO JOSÉ ROMÁN PÉREZ** sobre el tema: **EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE POR TALCO: PAPEL DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  $\alpha$ -TOCOFEROL**, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo la expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones que lo hagan acreedor del **GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA**, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Fdo. Prof. J Rodríguez Huertas

Granada 2005





DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
Facultad de Medicina  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DON FRANCISCO JAVIER GÓMEZ JIMÉNEZ**, Profesor Titular del  
Departamento de Medicina de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designa la Facultad de Medicina de Granada, **DON FRANCISCO JOSÉ ROMÁN PÉREZ** sobre el tema: **EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE POR TALCO: PAPEL DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  $\alpha$ -TOCOFEROL**, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo la expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones que lo hagan acreedor del **GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA**, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Fdo. Prof. FJ Gómez Jiménez

Granada 2005





DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
Facultad de Medicina  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DON FRANCISCO JULIO MIRAS PARRA**, Profesor Titular del  
Departamento de Medicina de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal que designa la Facultad de Medicina de Granada, **DON FRANCISCO JOSÉ ROMÁN PÉREZ** sobre el tema: **EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE POR TALCO: PAPEL DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  $\alpha$ -TOCOFEROL**, ha sido realizada bajo mi dirección, siendo la expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones que lo hagan acreedor del **GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA**, siempre que así lo considere el citado tribunal.

Fdo. Prof. FJ Miras Parra

Granada 2005





**A Elena.**

**Por nuestra felicidad y la que aún tiene que llegar.**

**Por los regalos más grandes que me has hecho**

**María y Raquel**



**A mis padres.**

**Sin su apoyo y sacrificio, yo no hubiera llegado hasta aquí.**



## **AGRADECIMIENTOS:**

Llegado el momento de hacer balance final de un trabajo que supone tanto para una persona como es la Tesis Doctoral, en el que se han invertido tres o cuatro años fundamentales, es necesario recordar y agradecer a tantas personas que han participado en el mismo y sin cuya ayuda y apoyo, científico, técnico y sobre todo humano, habría sido imposible llevar a cabo.

Al **Dr. Javier Gómez**, por sus enseñanzas y estímulo constante. Siempre sereno y comprensivo en todas las situaciones con las que me he ido encontrando en la realización de esta tesis doctoral.

Al **Dr. Jesús Rodríguez Huertas**, director de esta tesis, por haberme brindado su ayuda incondicional y su confianza. Gracias por estar ahí y ayudarme siempre que te he necesitado.

Al **Dr. Francisco J Miras Parra**, por su capacidad docente y su entrega desinteresada. Gracias por tu acogida en mis años de residencia en el Hospital Clínico.

Al personal del **Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INYTA)**, en especial al **Dr José Luis Quiles**, por ayudarme a dar los primeros pasos en el ámbito del laboratorio con gran disponibilidad y amistad.

Al **Dr. Juan Tormo Molina**, maestro en la Medicina y en la vida. Contigo empecé en serio esta profesión fascinante y eso nunca lo olvidaré. Haber compartido el trabajo contigo ha sido un privilegio. Gracias amigo.

A **D. José Garrido**, del departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada, paisano y amigo mío, por hacerme lo difícil fácil y estar a mi disposición en todo lo que he necesitado.



A los *Doctores Juan Román y Carmen Villaizán*, por su ayuda constante y por aguantarme, que no es fácil, en los momentos de dificultades y agobio durante la realización de esta tesis doctoral.

A *D. José Luis De Los Reyes*, por su ayuda desinteresada en los múltiples problemas informáticos que me han ido surgiendo durante la elaboración de esta tesis doctoral.





## **ÍNDICE**

---



## INTRODUCCIÓN

Página

<b>1.- ENFERMEDADES INTERSTICIALES DIFUSAS DE PULMÓN.</b>	<b>3</b>
1.1.- Etiología.	3
1.1.1.- Enfermedades de etiología desconocida.	4
1.1.2.- Enfermedades de etiología conocida.	5
1.2.- Patogenia.	5
1.2.1.- El parénquima pulmonar normal.	6
1.2.1.1.- Población celular.	6
1.2.1.2.- Matriz intersticial.	7
1.2.2.- Patogénesis de la fibrosis pulmonar difusa.	7
1.3.- Histopatología.	10
1.3.1.- Neumopatía intersticial descamativa.	11
1.3.2.- Neumopatía intersticial común o usual.	11
1.3.3.- Neumopatía intersticial linfoidea.	11
1.3.4.- Neumonitis intersticial no específica.	12
1.3.5.- Neumonía intersticial aguda.	12
1.4.- Clínica.	12
1.5.- Diagnóstico.	13
1.5.1.- Estudios de imagen.	14
1.5.1.1.- Radiografía convencional de tórax.	14
1.5.1.2.- Tomografía axial computerizada (TAC).	16
1.5.1.3.- Resonancia magnética nuclear (RMN).	17
1.5.1.4.- Centellografía pulmonar.	18
1.5.2.- Pruebas de función pulmonar.	19
1.5.3.- Estudios analíticos.	20

1.5.4.- Lavado broncoalveolar.	21
1.5.4.1.- Proteinosis alveolar.	23
1.5.4.2.- Síndrome hemorrágico pulmonar.	23
1.5.4.3.- Histiosis X.	23
1.5.5.- Biopsia pulmonar.	24
1.5.5.1.- Biopsia transbronquial.	24
1.5.5.2.- Biopsia pulmonar abierta por toracoscopia o minitoracotomía.	25
1.6.- Tratamiento.	25
1.6.1.- Tratamiento etiológico.	27
1.6.2.- Tratamiento sintomático.	27
1.6.2.1.- Agentes antiinflamatorios.	27
1.6.2.2.- Agentes antifibrosantes.	30
1.6.2.3.- Otras drogas.	31
1.6.3.- Tratamiento de apoyo.	31
1.6.3.1.- Oxigenoterapia domiciliaria.	32
1.6.3.2.- Programas de ejercicio.	32
1.6.3.3.- Dieta.	32
1.6.4.- Trasplante pulmonar.	32
1.6.5.- Posibilidades en el futuro del tratamiento médico.	34
1.6.5.1.- Inhibidores de las citoquinas.	34
1.6.5.2.- Inhibidores de los factores de crecimiento.	34
1.6.5.3.- Agentes antifibrosantes.	35
1.6.5.4.- Nuevos agentes antiinflamatorios.	35

## **2.- RADICALES LIBRES Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES. 36**

2.1.- Concepto de radical libre.	36
2.1.1.- Radical superóxido.	38

2.1.2.- Peróxido de hidrógeno.	40
2.1.3.- Radical hidroxilo.	41
2.1.4.- Oxígeno singlete.	42
2.1.5.- Ácido hipocloroso.	44
2.2.- Balance y estrés oxidativo.	45
2.3.- Fuentes de producción de radicales libres.	47
2.3.1.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial.	47
2.3.2.- Xantina oxidasa.	49
2.3.3.- Metabolismo del ácido araquidónico.	51
2.3.4.- Formación de radicales por células fagocíticas.	52
2.3.5.- Metabolismo de las catecolaminas.	53
2.3.6.- Citocromo P450.	54
2.3.7.- Contaminantes atmosféricos.	55
2.3.8.- Metales iónicos en la producción de radicales libres.	55
2.4.- Interacciones radicales libres e hidratos de carbono.	57
2.5.- Interacciones radicales libres y proteínas.	58
2.6.- Interacciones radicales libres y DNA.	61
2.7.- Interacciones radicales libres y lípidos.	63
2.7.1.- Iniciación.	65
2.7.2.- Propagación.	67
2.7.3.- Reacciones de terminación.	69
2.7.4.- Daño consecuente de la peroxidación.	70
2.7.4.1.- Daño directo a membranas.	70
2.7.4.2.- Efectos indirectos de la peroxidación. lipídica.	72
2.8.- Mecanismos antioxidantes.	74
2.8.1.- Mecanismos enzimáticos.	75
2.8.1.1.- Catalasa.	75

2.8.1.2.- Superóxido dismutasa.	77
2.8.1.3.- Glutación peroxidasa.	79
2.8.1.4.- Glutación reductasa.	82
2.8.2.- Mecanismos no enzimáticos.	82
2.8.2.1.- Vitamina E.	82
2.8.2.2.- Coenzima Q.	86
2.8.2.3.- Carotenoides.	89
2.8.2.4.- Vitamina C (ácido ascórbico).	91
2.8.2.5.- Ácido úrico.	93
2.8.2.6.- Glutación.	94
2.8.2.7.- N-acetilcisteína.	94
2.8.2.8.- Ferritina, hemosiderina, transferrina y ceruloplasmina.	95
<b>3.- OXIDANTES/ANTIOXIDANTES EN LA FIBROSIS PULMONAR.</b>	96
3.1.- Antioxidantes.	96
<b><u>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</u></b>	99
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	103
<b>1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.</b>	105

<b>2.- ANIMALES.</b>	105
<b>3.- DIETA.</b>	106
<b>4.- DISEÑO EXPERIMENTAL.</b>	106
4.1.- Grupo control o basal (FC).	107
4.2.- Grupo de fibrosis pulmonar inducida por talco (FT).	107
4.3.- Grupo de fibrosis pulmonar más ingesta de antioxidante (FTA).	107
<b>5.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.</b>	109
<b>6.- OBTENCIÓN DE PLASMA Y CÉLULAS SANGUÍNEAS.</b>	110
<b>7.- PROCESAMIENTO DE LOS ÓRGANOS Y OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES.</b>	111
<b>8.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN PLASMA.</b>	112
8.1.- Determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico en plasma.	112
8.2.- Determinación de coenzima Q, vitamina E y retinol plasmático por HPLC.	113
<b>9.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y PULMÓN.</b>	115

9.1.- Determinación cuantitativa de la proteína total.	115
9.2.- Determinación de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS).	115
9.3.- Cuantificación del nivel de hidroperóxidos existente en membranas.	116
9.4.- Extracción y determinación de ubiquinonas, vitamina E y retinol por HPLC en mitocondrias de hígado y pulmón.	117
<b>10.- DETERMINACIÓN EN CITOSOL DE HÍGADO Y PULMÓN.</b>	118
10.1.- Determinación de la actividad catalasa.	118
10.2.- Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).	119
10.3.- Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPX).	120
10.4.- Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR).	121
<b>11.- ESTUDIO HISTOLÓGICO.</b>	122
<b>12.- EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO.</b>	123
<b>13.- MÉTODOS BIBLIOGRÁFICOS.</b>	124
<b><u>RESULTADOS</u></b>	125



<b>1.- RESULTADOS GENERALES.</b>	129
1.1.- Peso de las ratas al sacrificio.	129
1.2.- Peso del hígado de las ratas al sacrificio.	130
1.3.- Peso de los pulmones de las ratas al sacrificio.	131
<b>2.- RESULTADOS EN PLAMA.</b>	132
2.1.- TBARS.	132
2.2.- Coenzima Q <sub>9</sub> .	132
2.3.- Vitamina E.	133
2.4.- Vitamina A (retinol).	134
<b>3.- RESULTADOS EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO.</b>	136
3.1.- Proteína.	136
3.2.- TBARS.	137
3.3.- Hidroperóxidos basales (T <sub>0</sub> ).	137
3.4.- Coenzima Q <sub>9</sub> .	138
3.5.- Coenzima Q <sub>10</sub> .	139
3.6.- Vitamina A.	140
<b>4.- RESULTADOS EN CITOSOL DE HÍGADO.</b>	142
4.1.- Superóxido dismutasa (SOD).	142
4.2.- Catalasa.	143
4.3.- Glutación peroxidasa (GPX).	144
<b>5.- RESULTADOS EN MITOCONDRIAS DE PULMÓN.</b>	145

5.1.- Proteína.	145
5.2.- TBARS.	145
5.3.- Hidroperóxidos basales (T <sub>0</sub> ).	146
5.4.- Coenzima Q <sub>9</sub> .	147
5.5.- Coenzima Q <sub>10</sub> .	148
5.6.- Vitamina A.	149
<b>6.- RESULTADOS EN CITOSOL DE PULMÓN.</b>	<b>151</b>
6.1.- Superóxido dismutasa (SOD).	151
6.2.- Catalasa.	152
6.3.- Glutación peroxidasa (GPX).	152
<b>7.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.</b>	<b>154</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>159</b>
<b>1.- CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO.</b>	<b>165</b>
<b>2.- CUANTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.</b>	<b>167</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>175</b>

**BIBLIOGRAFÍA**

179

**ANEXO: TABLAS**

213



## GLOSARIO

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
$^{99}\text{m-Tc-DTPA}$	Ácido pentaacético de dietilenetriamina marcado con tecnecio 99
$\alpha\text{-TO}\cdot$	Radical $\alpha$ -tocoferoxilo
$\alpha\text{-TS}$	$\alpha$ -tocoferol succinato
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
AR	Artritis reumatoide
Asch $^-$	Ascorbato
Asc $^-$	Radical semidihidro ascorbato
$\text{CCL}_3$	Triclorometilo
ClOH	Acido hipocloroso
$\text{CCl}_3\text{O}_2^-$	Radical triclorometiloperóxido
CoQ	Coenzima Q
CoQ <sub>9</sub>	Coenzima Q <sub>9</sub>
CoQ <sub>10</sub>	Coenzima Q <sub>10</sub>
DHA	Dihidroascórbico
DLCO	Capacidad de difusión del monóxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIDP	Enfermedades intersticiales difusas del pulmón
EEM	Error estandar de la media
ERO	Especies reactivas del oxígeno
FCV	Capacidad vital forzada
FEV1	Volumen de aire expirado en el primer segundo
FEV <sub>25-75%</sub>	Flujo expiratorio máximo entre el 25-75%
FC	Grupo control
FT	Grupo fibrosis pulmonar inducida por talco
FTA	Grupo fibrosis pulmonar+ingesta de antioxidante
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
GPX	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HO $^-$	Radical hidroxilo
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleukina
Ig	Inmunoglobulina
LBA	Lavado bronquioalveolar
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LOO $\cdot$	Radical peroxilipídico
LO $\cdot$	Radical alcoxilipídico
L.	Radical lipídico
HNE	4 hidroxinonenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión

NAC	N-acetilcisteína
MDA	Malondialdehido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido difosfato
NO	Óxido nítrico
NO·	Radical nitroxi
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
PaO <sub>2</sub>	Presión parcial de de oxígeno
PGG	Prostaglandina
RNA	Ácido ribonucleico
RNM	Resonancia nuclear magnética
Rx	Radiografía
R.	Radical -ilo
ROOH	Peróxido
ROO·	Radical peroxilo
RO·	Radical alcoxilo
-SH	Grupo sulfidrilo
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
SOD	Superóxido dismutasa
TAC	Tomografía axial computerizada
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico
TLC	Capacidad pulmonar total
TNF	Tumor de necrosis tumoral

# **INTRODUCCIÓN**





## **1.- ENFERMEDADES INTERSTICIALES DIFUSAS DE PULMÓN.**

Bajo el término de enfermedades intersticiales difusas del pulmón (EIDP) (también denominadas neumopatías intersticiales difusas o enfermedades fibrosantes del pulmón), se agrupan un gran número de procesos respiratorios normalmente subagudos y crónicos, que se caracterizan por comprometer difusamente el parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y a los espacios alveolares, aunque muchas de ellas también producen lesiones de vías aéreas periféricas. A pesar de su gran heterogeneidad, las EIDP pueden agruparse porque presentan rasgos clínicos, radiológicos y funcionales similares. (*Selman M, 1996; Gross TJ et al., 2001; Talmadge E, 2005*).

La incidencia y prevalencia de este tipo de enfermedades fibrosantes del pulmón no se conoce con precisión, debido fundamentalmente a que constituyen un grupo extraordinariamente heterogéneo, para su diagnóstico se requiere un buen grado de sospecha clínica y las estadísticas son poco fiables en la mayoría de los países en vías de desarrollo. De esta manera, la magnitud del problema se desconoce. Suele afectar a la población comprendida entre los 50-70 años (*Kamp DW et al., 2003*). Se estima que la prevalencia en los Estados Unidos es de al menos 10 casos por 100000 habitantes (*Selman M, 1996; American Thoracic Society, 2002*).

### **1.1.- ETIOLOGÍA.**

La etiología de las EIDP es muy variada. En la actualidad se conocen más de 180 causas diferentes, aunque sólo en el 35-45% de los casos es posible identificar el agente causal (*Selman M, 1996; Xaubet A et al., 2000*;

Talmadge E, 2005). En relación con su etiología, las enfermedades intersticiales se dividen en dos grandes grupos:

### **1.1.1.- Enfermedades de etiología desconocida.**

Fibrosis pulmonar idiopática.  
Sarcoidosis.  
Asociadas a colagenosis.  
LES.  
AR.  
Esclerodermia.  
Síndrome de Sjögren.  
Polimiositis-dermatomiositis.  
Síndrome de hemorragia pulmonar.  
Hemosiderosis pulmonar idiopática.  
Síndrome de Goodpasture.  
Trastornos hereditarios.  
Esclerosis tuberosa.  
Neurofibromatosis.  
Enfermedad de Niemann-Pick.  
Enfermedad de Gaucher.  
Síndrome de Hermansky-Pudlak.  
Histiocitosis X.  
Linfangioliomatosis.  
Síndromes pulmonares idiopáticos.  
Trastornos infiltrativos linfocitarios.  
Neumonía intersticial linfocítica asociada a enfermedades colageno-vasculares.  
Neumonía eosinófila crónica.  
Espondilitis anquilopoyética.  
Enfermedad venooclusiva.  
Proteinosis alveolar.  
Vasculitis granulomatosas.  
Granulomatosis de Wegener.  
Granulomatosis de Churg-Strauss.

Granulomatosis linfomatosa.

Granulomatosis bronquiocéntrica.

### **1.1.2.- Enfermedades de etiología conocida.**

Inhalaciones ocupacionales y medioambientales.

Polvos orgánicos.

Polvos inorgánicos.

Gases, vapores y aerosoles.

Fármacos.

Venenos.

Radiaciones.

Secuelas del síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

Agentes infecciosos.

Patología cardíaca.

Alteraciones metabólicas.

Neumonitis por hipersensibilidad (polvos orgánicos).

## **1.2.- PATOGENIA.**

La secuencia de los eventos que preceden y acompañan el excesivo depósito de colágeno en el pulmón, característica bioquímica de las EPDI, no se conoce con precisión.

Las alteraciones patológicas afectan fundamentalmente, a las estructuras celulares y moleculares que forman parte del parénquima pulmonar y provocan la destrucción de las unidades alveolo-capilares con cambios irreversibles en la arquitectura y función de este órgano.

Aunque el agente o las circunstancias iniciadoras pueden ser variables y muchas de ellas son desconocidas, las respuestas inmunopatógenas del tejido pulmonar son limitadas, de tal forma que los

mecanismos iniciales de la lesión, el desarrollo de alveolitis y los intentos de reparación que producen fibrosis, tienen rasgos comunes (*Xaubet A et al., 2000; KampDW et al., 2003; Selman M, 2004; Talmadge E, 2005*).

### **1.2.1.- El parénquima pulmonar normal.**

#### **1.2.1.1.- Población celular.**

El pulmón adulto normal contiene aproximadamente  $300 \times 10^6$  alvéolos que cubren una superficie de  $100 \text{ m}^2$ . El epitelio alveolar está compuesto por dos diferentes tipos celulares; neumocitos tipo I (cubren alrededor del 95% de la superficie alveolar, favoreciendo el intercambio gaseoso) y neumocitos tipo II (cubren el 5% restante, son progenitoras de neumocitos tipo I y son los responsables de sintetizar el surfactante).

En el espacio intersticial se encuentran las células mesenquimatosas, entre las cuales se incluyen: fibroblastos (responsables, principalmente, de la síntesis de la matriz intersticial); pericitos y miofibroblastos (estos dos tipos celulares sin funciones bien definidas).

Normalmente, entremezcladas o recubriendo a los alveolos existen células inmunitarias como macrófagos intersticiales, macrófagos alveolares, monocitos intersticiales, linfocitos y células inflamatorias, como polimorfonucleares y eosinófilos. En la población linfocitaria, la proporción entre células T CD4 colaboradoras y células T CD8 supresoras/citotóxicas es de 1.5 aproximadamente (*Selman M, 1996; Talmadge E, 2005*).

### **1.2.1.2.- Matriz intersticial.**

Los principales componentes de esta estructura macromolecular (matriz extracelular) son las colágenas, fibras elásticas, proteoglicanos y fibronectina.

En el parénquima pulmonar normal se encuentran al menos cinco tipos diferentes de fibras colágenas, de las cuales las más abundantes son las tipo I y III (proporción 2:1). Las fibras elásticas son cruciales para las propiedades mecánicas del pulmón. Los proteoglicanos son de especial importancia para la manutención de la estructura y función del órgano. La función de la fibronectina, aún no está muy aclarada, se le ha atribuido un cierto papel sobre formación, adhesión y migración celular (*Hay ED, 1981*).

### **1.2.2.- Patogénesis de la fibrosis pulmonar difusa.**

Dependiendo del agente agresor, cualquier célula del parénquima pulmonar puede ser dañada o estimulada y la respuesta pulmonar representa un balance entre el tipo de células afectadas, la magnitud de la agresión y el comportamiento de los mecanismos de defensa iniciados por el daño. En términos generales, el daño puede iniciarse con la necrosis del epitelio y/o endotelio capilar, aumento de la permeabilidad de los neumocitos tipo I y células endoteliales adyacentes, o con la estimulación exagerada de células inflamatorias o inmunocompetentes (*Strieter RM, 2002*). Especial importancia presenta la pérdida de integridad de las membranas basales; lo cual facilitaría la salida de fibroblastos a los espacios alveolares y representaría un estímulo para la fibrogénesis tanto intersticial como intraalveolar. El estímulo desencadenante es probable que

pueda iniciar una respuesta inmunitaria (*Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*). Este hecho se refleja en un aumento de las subclases de IgG, IgG1 e IgG3, un aumento de células secretoras de IgG y por la formación de inmunocomplejos, detectables en el suero y pulmón de estos pacientes (*Alvarez-Sala R et al., 1993; McNee I et al., 1995; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*). La presencia dentro de las estructuras alveolares de estos inmunocomplejos, podría iniciar y mantener la respuesta inflamatoria al atraer varias poblaciones celulares (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Sueiro A et al., 1998; Strieter RM et al., 2002*).

Los macrófagos son los componentes celulares esenciales en la respuesta inflamatoria y en la fibrosis. En la etapa inicial (de alveolitis), son fagocitos activos y los encargados de segregar “factores” que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la lesión y “factores” que contribuyen a la adhesión de dichas células (*Sueiro A et al., 1998; Selman M et al., 2004*). Entre los factores secretados se encuentran: factor B de crecimiento transformador, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento plaquetar, IL-1, IL-6, interferón y factor de crecimiento tipo insulina (*Persoons JH et al., 1995; Nakamura H et al., 1995; Homma S et al., 1995; Whyte m ET AL., 2000*). La lesión pulmonar sería el resultado de la acción de las citoquinas macrofágicas descritas, directamente TNF o a través del reclutamiento y activación de neutrófilos y otras células (*Selman M, 1996; Talmadge E, 2005*).

Las citoquinas producen un daño directo sobre los neumocitos pulmonares y la exudación de fibrina hacia el espacio alveolar. Los neumocitos tipo II activados, revisten los septos alveolares fibróticos e intervienen en la reparación del revestimiento epitelial alveolar; producen

surfactante, liberan citoquinas in situ que intervienen en la regulación de la fibrogénesis y expresan TNF, citoquina esta muy importante ya que estimula la adherencia y extravasación celular del endotelio y produce factores quimiotácticos para neutrófilos (IL8, CSF) (*Selman M, 2004*).

Los linfocitos T citotóxicos, eosinófilos y fibroblastos, al igual que los macrófagos, son también células protagonistas en el curso de la enfermedad, mediante la liberación de citoquinas fibrogénicas como el factor transformador de crecimiento, leucotrienos B4 y C4, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor I de crecimiento insulina-like y eicosanoides (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998*).

El factor transformador de crecimiento liberado por macrófagos y células epiteliales, incrementaría la síntesis de colágenas (tejido conectivo) por los propios fibroblastos y activaría la expresión de los genes codificadores de proteínas del tejido conectivo y de inhibidores de proteasas, contribuyendo decisivamente a la instauración de la fibrosis (*Selman M, 1996*).

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas ha demostrado ser un potente inductor en la proliferación de fibroblastos. Este factor de crecimiento se encuentra aumentado en pulmones fibróticos, mientras que es indetectable en pulmones normales (*Selman M, 1996*).

La hiperproducción de leucotrienos B4 y C4 estimularía la proliferación y quimioprofilaxis fibroblástica, además de intervenir directamente en la lesión pulmonar como quimiotácticos para neutrófilos (*Lesur O et al., 1995; Oda H et al., 1995*).

En los últimos años, ha tomado especial relevancia el efecto de los oxidante/antioxidantes en la patogenia de las EIDP, así como en otros procesos respiratorios. La secreción de oxidantes está incrementada y se lleva a cabo por los macrófagos alveolares y neutrófilos activados. El hecho responsable de incrementar esta secreción de oxidantes, parece ser la presencia de inmunocomplejos en los pulmones de estos pacientes (*Hunninghake G et al., 1995; MacNee W et al, 1995; Peterson M et al., 1998; Yucesoy B et al., 2005*).

El papel de los oxidantes en el desarrollo de fibrosis pulmonar no está del todo aclarado. Han sido implicados en una lesión directa sobre el epitelio pulmonar (*McNee W et al., 1995; Mastruzzo C et al., 2002; Talmadge E, 2005*); así como en un aumento de la permeabilidad de dicho epitelio (*MacNee W et al., 1995; Talmadge E, 2005*). Esta última acción ha quedado en discusión dado que se ha objetivado que la generación de oxidantes en una fibrosis pulmonar inducida por asbestos no aumenta la permeabilidad del epitelio pulmonar (*Peterson M et al., 1998*).

Se ha comprobado, un importante desequilibrio en el tracto respiratorio inferior, entre oxidantes/antioxidantes, a favor de los primeros, en pacientes con fibrosis pulmonar (*Hunninghake G et al., 1995; McNee W et al., 1995; Peterson M et al., 1998; Mastruzzo C et al., 2002*).

### **1.3.- HISTOPATOLOGÍA.**

Se ha tipificado la EIDP en cinco categorías histopatológicas (*Sueiro A et al., 1998; Selman M et al., 2001; Khalil N et al., 2004*). Algunas de ellas parecen corresponder a distintas fases del mismo proceso:



### **1.3.1.- *Neumopatía intersticial descamativa.***

Se caracteriza por un acúmulo masivo de macrófagos alveolares dentro de los espacios alveolares, con frecuentes mitosis y rodeados por septos uniformemente engrosados revestidos por neumocitos. Un rasgo distintivo de la neumonía intersticial descamativa es la afectación difusa, con un patrón uniforme de fibrosis rodeando a los macrófagos alveolares.

### **1.3.2.- *Neumopatía intersticial común o usual.***

Muestra mayor heterogeneidad patológica y mayor grado de fibrosis asociada al componente inflamatorio, con una importante sustitución irregular de la pared septal alveolar por colágeno maduro, con colapso de la estructura alveolar y formación de zonas quísticas revestidas de células metaplásicas (pulmón en panal). La presencia de proteoglicanos y ácido hialurónico aumentados en zonas de fibrosis inicial, adyacentes a las de colapso alveolar activo, es característica de la neumonía intersticial común. El aumento de colágeno pulmonar total que se constata en la neumonía intersticial común es de tipo I, que predomina sobre el tipo III.

### **1.3.3.- *Neumopatía intersticial linfoidea.***

Predomina el componente linfocitario intersticial que infiltra los septos junto a eosinófilos y macrófagos. La fibrosis que acompaña este proceso puede ser de intensidad leve a moderada, uniforme y respeta los límites del septo alveolar. Se pueden observar granulomas no caseosos en la neumonía intersticial linfoidea.

#### **1.3.4.- Neumonitis intersticial no específica.**

Habitualmente asociada a enfermedades conectivo-vasculares y a daño pulmonar inducido por fármacos. Se caracteriza por una mezcla de fibrosis intersticial e inflamación poco uniforme. No hay evidencia de colapso pulmonar importante o sustitución por tejido conectivo denso.

#### **1.3.5.- Neumonía intersticial aguda.**

Se caracteriza por una combinación de fibrosis intersticial y edema asociados a una hiperplasia de células neumocitos tipo II, junto a una proliferación de fibroblastos con una pequeña deposición de colágeno.

### **1.4.- CLÍNICA.**

Dado que el curso clínico suele comenzar de forma insidiosa, Es esencial realizar una historia laboral detallada en caso de sospecha.

Las principales manifestaciones suelen ser disnea de esfuerzo y tos seca o con expectoración mucosa escasa. La hemoptisis es muy rara, salvo en los síndromes pulmonares hemorrágicos (hemosiderosis, síndrome de Goodpasture); en la enfermedad pulmonar veno-oclusiva y en la linfangioleiomatosis (*Selman M, 1996*). Algunos pacientes pueden presentar síntomas sistémicos incluyendo, entre otros, fiebre, artralgias, fenómeno de Raynaud, anorexia y pérdida de peso. Estos hallazgos clínicos no se suelen correlacionar con ningún proceso histopatológico en particular, aunque la cianosis y las acropaquias son más característicos de estadios fibróticos finales (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; American Toracic Society, 2002*).

Por lo general, pasan meses o años entre el comienzo de la disnea de esfuerzo y su progresión hasta la disnea de reposo, apareciendo la clínica de insuficiencia respiratoria, hipertensión pulmonar y cor pulmonale en estadios finales (*American Thoracic Society, 2002*).

La exploración física, puede no ser reveladora en estadios iniciales. A medida que avanza la enfermedad, aparecen estertores secos o durante la inspiración, principalmente en las bases pulmonares. En estadios avanzados existe taquipnea de reposo, cianosis y acropaquias en las manos y pies, junto a cor pulmonale, con signos de hipertensión pulmonar (acentuación del segundo tono pulmonar o desviación del impulso apical a la derecha) y finalmente signos de insuficiencia cardiaca derecha (*Talmadge E, 2005*).

### **1.5.- DIAGNÓSTICO.**

Las bases fundamentales para el diagnóstico de la EIDP son:

El grado de sospecha clínica.

El interrogatorio cuidadoso de la historia ocupacional, ambiental, del uso de medicamentos y ambientes familiares de enfermedades similares y hereditarias.

Diagnóstico por imagen (Rx de tórax, TAC, RNM...).

Alteraciones funcionales respiratorias típicas.

### **1.5.1.- Estudios de imagen.**

#### **1.5.1.1.- Radiografía convencional de tórax.**

A pesar de que la radiografía de tórax posee escasa sensibilidad, continúa siendo valiosa en la detección de patología pulmonar intersticial. Uno de los primeros signos radiológicos sugestivo de enfermedad pulmonar del parénquima es la pérdida de nitidez de los vasos pulmonares (*Hansell D et al., 1991; Selman M, 1996*).

La imagen en “vidrio deslustrado”, es un patrón radiológico que aparece en estadios iniciales y sugiere la presencia de alveolitis relativamente temprana y, por lo tanto, reversible (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*). A medida que avanza la enfermedad, puede ir presentando uno o varios de los siguientes patrones.

##### 1) Patrón nodular:

Se caracteriza por lesiones esféricas, homogéneas, bien circunscritas y de varios tamaños. Una forma de patrón nodular está representado por el patrón miliar, en el cual los nódulos son de pocos milímetros de diámetro. La sarcoidosis, la silicosis y la talcosis suelen presentar este tipo de patrón.

##### 2) Patrón reticular:

Semeja una malla o red sobre el pulmón. El retículo puede ser fino o grueso y evoluciona hasta mostrar áreas quísticas de 5-10 milímetros de diámetro visibles en el intersticio engrosado (“pulmón en panal”) y

representa un pulmón en estado terminal (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*). Todas las enfermedades intersticiales difusas que progresan hacia fibrosis terminan dando este patrón radiológico, que es de muy mal pronóstico.

Aunque tanto las imágenes nodulares como reticulares pueden observarse de forma pura, lo más frecuente es encontrar una combinación de imágenes que se denomina patrón retículo-nodular.

### 3) Patrón lineal:

Es producido por el engrosamiento de los septos interlobares y el intersticio perivenoso.

### 4) Patrón acinar:

Realmente es el patrón alveolar clásico.

En general, la mayoría de las enfermedades intersticiales difusas muestran disminución radiográfica de los volúmenes pulmonares.

Exceptuando el “pulmón en panal”, la radiografía convencional de tórax se correlaciona pobremente con el estadio de este tipo de enfermedades y no ayuda a determinar un pronóstico (*Selman M, 1996*).

Otras anomalías radiográficas que se pueden observar en pacientes con EIDP, de forma breve, son: derrame pleural, neumotórax, cardiomegalia, derrame pericárdico, adenopatías, nivel aire-líquido en esófago, etc.

### **1.5.1.2.- Tomografía axial computerizada (TAC).**

La TAC permite determinar con mayor precisión el tipo, la distribución y severidad de las anomalías del parénquima pulmonar.

En general se aconseja el uso combinado de la TAC convencional con la TAC de alta resolución porque, si bien la TAC de alta resolución origina una óptima visualización del parénquima pulmonar, puede perder algunas anomalías, a menos que se realice también la TAC convencional. Análogamente, las imágenes de la TAC de alta resolución pueden ser difíciles de interpretar, si no se comparan con la TAC convencional (*Hansell D et al., 1991*).

Las principales anomalías que se pueden observar en las distintas enfermedades intersticiales incluyen:

- 1) Imagen en vidrio despolido.
- 2) Imágenes nodulares.
- 3) Opacidades lineales irregulares.
- 4) Zonas de interconexión anormales entre bronquios, vasos y pleuravisceral, con el parénquima pulmonar.
- 5) Imágenes quísticas.

En términos generales, estas imágenes se interpretan de la misma manera que la radiografía convencional.

La densidad en “vidrio deslustrado” resulta de anomalías morfológicas que reflejan, o un mínimo engrosamiento del intersticio alveolar, o un llenado de los espacios alveolares. La presencia de opacidades en vidrio deslustrado en ausencia de dilataciones de las vías aéreas por tracción es un indicador confiable de inflamación pulmonar.

Los nódulos pulmonares intersticiales tienden a ser densos y bien definidos. Nódulos pequeños, miliares, de 1 a 2 mm. de diámetro se pueden observar en la sarcoidosis, silicosis, tuberculosis...

Los pacientes con severa fibrosis y pulmón en panal también muestran las llamadas bronquiectasias de tracción, que son áreas irregulares y tortuosas de dilatación bronquial.

La TAC de alta resolución aumenta la rentabilidad diagnóstica de la biopsia transbronquial y la biopsia pulmonar abierta, al poder discernir correctamente las zonas más afectas (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Sueiro A et al., 1998*).

### **1.5.1.3.- Resonancia magnética nuclear (RNM).**

La aplicación clínica de la RNM en las EIDP no se ha extendido, principalmente, debido al movimiento fisiológico de los pulmones en inspiración y espiración, así como la peculiar combinación de aire y tejidos que constituyen un pulmón, todo lo cual altera la calidad de la imagen.

#### **1.5.1.4.- Centellografía pulmonar.**

Dos procedimientos no invasivos que utilizan radioisótopos y que se han postulado para evaluar la “actividad” en las enfermedades intersticiales difusas son la centellografía con galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ) y el análisis de depuración del ácido pentaacético de dietilenetriamina marcado con tecnecio-99-m ( $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ ).

##### 1) Centellografía con galio-67:

Esta prueba es útil para determinar la presencia y extensión de la inflamación pulmonar y su respuesta al tratamiento, así como para identificar la presencia de alveolitis subclínica (*Selman M, 1996*).

El  $^{67}\text{Ga}$  no se acumula en los pulmones normales o su captación es mínima, mientras que en condiciones patológicas pueden observarse diversos grados de acumulación. La principal célula responsable de la captación del  $^{67}\text{Ga}$  es el macrófago alveolar, aunque probablemente exista una cierta incorporación a los neutrófilos.

La centellografía con  $^{67}\text{Ga}$  es muy sensible para evaluar la inflamación, pero no es diagnóstica de ninguna EIDP en particular. Tiene dudoso o ningún efecto pronóstico al no correlacionarse con el grado de fibrosis.

2) Análisis de depuración del ácido pentaacético de dietilenetriamina marcado con tecnecio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ ).



Los aerosoles de  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA han sido utilizados para evaluar la pérdida de integridad del epitelio alveolar provocada por diferentes lesiones pulmonares. Después de dos minutos de inhalación del aerosol, la tasa de aclaramiento en sujetos normales es de 2.49% por minuto y nunca sobrepasa el 4% por minuto. En los pacientes con daño del parénquima pulmonar, la tasa de aclaramiento se incrementa significativamente.

Este estudio es inespecífico para ser un indicador clínicamente útil en el estudio de este tipo de enfermedades (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998*).

### **1.5.2.- Pruebas de función pulmonar.**

El estudio de la función pulmonar reviste interés, principalmente, en tres aspectos:

1) En la mayoría de los casos constituyen un elemento básico para el diagnóstico. La alteración de la función pulmonar puede ser la primera manifestación de esta patología (15% de los casos), incluso antes de las manifestaciones clínicas.

2) La exploración funcional respiratoria se correlaciona bien con el grado de desestructuración del parénquima pulmonar; por tanto, constituye una información esencial para conocer la gravedad de estas enfermedades y es una buena guía para el control evolutivo.

El patrón espirométrico característico de las neumopatías intersticiales es la alteración ventilatoria tipo restrictivo (no obstructivo), caracterizada por la disminución del volumen máximo espirado o

capacidad vital forzada (FCV) con indemnidad de flujos espiratorios máximos como el volumen de aire espirado durante el primer segundo de la espiración forzada (FEV1), o el flujo espiratorio máximo entre el 25 y el 75% de la FVC (FEV25-75%). Se observa una característica elevación del cociente FEV1/FCV (>85%) (índice de Tiffeneau). Otra característica es la disminución de la capacidad pulmonar total (TLC) y de las diferentes subdivisiones de los volúmenes pulmonares (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Green F, 2002; Talmadge E, 2005*).

Las alteraciones más sensibles del funcionalismo pulmonar y del intercambio gaseoso en este tipo de enfermedades incluyen el descenso de la PaO<sub>2</sub>, un aumento del gradiente alveolo-arterial de oxígeno al esfuerzo y una disminución de la capacidad de difusión de monóxido de carbono en respiración única (DLCO) (*Tenholder MF et al., 1987; Green F, 2002*).

Se ha objetivado que, excepto en el estadio de enfermedad avanzada, existe una pobre correlación entre la afectación radiológica y los estudios de función pulmonar incluyendo la espirometría y la DLCO. Se describen, asimismo, casos con extensos infiltrados radiológicos y leves alteraciones de la función pulmonar (*Sueiro A et al., 1998*).

### **1.5.3.- Estudios analíticos.**

Las pruebas de laboratorio son, en general, bastante inespecíficas. Normalmente se detecta un aumento de la velocidad de sedimentación globular y de las inmunoglobulinas (Ig), sobre todo de la IgG y, a veces, la presencia de inmunocomplejos circulantes. Con frecuencia aparecen también títulos aumentados de anticuerpos antinucleares (7-25%), factor

reumatoide (14%), crioglobulinas (41%) y bajos niveles de complemento (6%) (*Alvarez-Sala, R. et al., 1993; Green F, 2002; Talmadge E, 2005*).

La presencia de los marcadores inmunológicos anteriormente descritos en suero no parece modificar la historia natural de la fibrosis pulmonar idiopática y aparecen con mayor frecuencia en pacientes que responden al tratamiento.

#### **1.5.4.- Lavado broncoalveolar.**

El lavado broncoalveolar (LBA), se ha propuesto, específicamente en EIDP, como una prueba de utilidad para analizar la actividad inflamatoria y fibrogénica, para tomar decisiones terapéuticas y evaluar el seguimiento de la enfermedad.

Consiste, básicamente, en la introducción de cierta cantidad de líquido a través de un fibrobroncoscopio que llega hasta el parénquima pulmonar. Este fluido posteriormente, se aspira y analiza. Recoge células aproximadamente de un millón de alveolos. No permite recoger, sin embargo, las células del intersticio, en el que predominan linfocitos T, células plasmáticas, mastocitos y macrófagos con el fenotipo diferente a los alveolares (*Alvarez-Sala R et al., 1993*). Es posible que en algunas neumopatías intersticiales específicas las células obtenidas en el LBA, reflejen realmente lo que está ocurriendo en el parénquima pulmonar en su conjunto, en tanto que en otras no (*Selman M, 1996; Green F, 2002*).

El LBA, si bien ha generado ciertos conocimientos sobre los componentes celulares y moleculares intrapulmonares, así como de algunos eventos fisiopatológicos, su utilidad clínica en el estudio de las EIDP es,

hasta la fecha, limitado. Se debería realizar como otra prueba diagnóstica más, antes de pasar a técnicas más agresivas (*Sueiro A et al., 1998; Green F, 2000*).

En condiciones normales y en sujetos no fumadores, aproximadamente el 85-90% de las células, recuperadas por LBA, son macrófagos alveolares, el 10-15% restante son linfocitos y los granulocitos polimorfonucleares constituyen menos del 1%. El hábito tabáquico produce cambios importantes en el número total de células inflamatorias, así como de sus proporciones porcentuales induciendo, generalmente, una disminución en el porcentaje de linfocitos (*Selman M, 1996*).

Una de las neumopatías intersticiales más estudiadas con este procedimiento ha sido la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Aparece un aumento del número total de células inflamatorias en LBA. Frecuentemente se observan alteraciones de dos o más líneas celulares, entre las que predomina la neutrofilia, asociada habitualmente a eosinofilia. Un 10% de FPI pueden presentar linfocitosis y los mastocitos pueden también hallarse en un 2-3% (*Cherniak RM, 1990*).

La eosinofilia en el LBA se presenta en un 45-50% de los casos alcanzando hasta un 75% con microscopía electrónica. Su presencia parece asociarse a una pobre respuesta a los corticosteroides, así como a enfermedad evolucionada; si bien algunos autores encuentran solamente una correlación entre eosinofilia mayor al 5% con alteración pulmonar severa (*Walter Ch et al., 1994*).

En algunos trabajos se ha demostrado como un aumento del recuento linfocitario en el fluido alveolar de enfermos con FPI se asocia con un

mejor pronóstico y una respuesta al tratamiento más favorable (*Stollen JK et al., 1987; Haslam PL et al., 1992*). Parece ser que estas células se encuentran elevadas en las primeras fases de la enfermedad.

En la FPI, se ha podido observar un aumento, en el LBA, de albúmina, IgG, IgA, enzima conversor de angiotensina, colagenasa, elastasa, mieloperoxidasa, ácido hialurónico, procolágeno III e histamina entre otros. Niveles elevados de histamina se asocian a un mayor grado de fibrosis (*Sueiro A et al., 1998*).

Como regla general, el LBA ocupa un lugar muy limitado en el diagnóstico específico de las EIDP aunque, en mayor o menor medida existen excepciones. Entre las más importantes se encuentran:

#### **1.5.4.1.- Proteinosis alveolar:**

Macroscópicamente, el líquido obtenido en LBA es generalmente blanco lechoso y turbio. Microscópicamente se puede observar el material proteináceo que se tiñe positivamente con el ácido de Schiff (PAS).

#### **1.5.4.2.- Síndrome hemorrágico pulmonar:**

La presencia de numerosos macrófagos alveolares cargados de hemosiderina puede ayudar al diagnóstico.

#### **1.5.4.3.- Histiosis X:**

Se pueden encontrar células que, examinadas con microscopio electrónico, revelan los llamados cuerpos X (gránulos de Birbeck). El

hallazgo de células de Langerhans en el LBA debe tomarse con precaución dado que este tipo de células pueden presentarse en otras EIDP.

#### **1.5.5.- Biopsia pulmonar.**

La biopsia pulmonar, conduce a un diagnóstico definitivo. Se puede considerar como la herramienta diagnóstica más precisa en una EIDP de etiología desconocida. No sólo sirve para establecer el diagnóstico preciso, sino que también desempeña un papel en la planificación del tratamiento, permite estadiar la enfermedad, orienta el pronóstico y, finalmente, es útil para investigación sobre mecanismos patógenos (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Green F, 2002*).

Los principales métodos que se utilizan actualmente para la realización de una biopsia pulmonar son, principalmente, dos:

##### **1.5.5.1.- Biopsia transbronquial:**

Su papel diagnóstico en este tipo de enfermedades es muy limitado; presentando una especificidad y sensibilidad relativamente bajas.

La biopsia transbronquial presenta varios problemas. En primer lugar, las muestras son tomadas a ciegas con fuertes posibilidades de muestreo erróneo. Asimismo, el tejido es generalmente maltratado y el tamaño de la muestra es pequeño (1-3 milímetros) (*Sueiro A et al., 1998; Hunninghake GW et al., 2001*).

### **1.5.5.2.- Biopsia pulmonar abierta por toracoscopia o minitoracotomía:**

La biopsia pulmonar abierta se sigue considerando la técnica de elección a causa, principalmente, de la gran cantidad de tejido que permite obtener y a la posibilidad, en la mayoría de los casos, de poder tomar muestras en más de un lugar. La biopsia pulmonar abierta posee la mayor rentabilidad en la confirmación diagnóstica de las EIDP (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Green F, 2002*).

Es relativamente segura con poca morbilidad y menos del 1% de mortalidad. Habitualmente se contraindica en pacientes ancianos o que padecen una enfermedad cardiovascular o pulmonar severa. En estos casos, puede realizarse una fibrobroncoscopia con biopsia transbronquial.

En los últimos años se está realizando, cada vez más, la biopsia pulmonar por videotoracoscopia presentando una alta especificidad diagnóstica, comparable con la que se espera en la biopsia a cielo abierto (*Morales J et al., 1986*). Esta técnica representa mayor comodidad y menos riesgos para el paciente por lo que está reemplazando a la biopsia a cielo abierto.

## **1.6.- TRATAMIENTO.**

Las enfermedades fibrosantes del pulmón aunque de evolución variable, son generalmente progresivas y letales en un plazo relativamente breve. En términos generales se acepta que, una vez que la fibrosis se ha desarrollado, la vida media es sólo del 50% a lo cinco años (*Pérez-Padilla R et al., 1993*). La terapia con corticosteroides constituye el tratamiento convencional y el uso de drogas inmunosupresoras generalmente se reserva

para pacientes que no responden al tratamiento esteroideo. En la mayoría de las enfermedades fibrosantes, no existen parámetros predictivos fiables que permitan conocer la evolución del paciente al tratamiento (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Selman M, 1996; Selman M et al, 2004*).

Se dispone de escasos ensayos terapéuticos, la mayoría de ellos son no controlados y de reducido número de pacientes (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998*).

En el siguiente esquema se presentan las piezas principales que se deben considerar en el manejo de un paciente con EIDP.

**1.6.1.- Tratamiento etiológico.**

**1.6.2.- Tratamiento sintomático.**

**1.6.2.1.- Agentes antiinflamatorios.**

- 1) Corticoides.
- 2) Azatioprina, ciclofosfamida y ciclosporina A.
- 3) Antioxidantes.

**1.6.2.2.- Agentes antifibrosantes.**

- 1) D-penicilamina.
- 2) Colchicina.
- 3) Captopril.

**1.6.2.3.- Otras drogas.**

**1.6.3.- Tratamiento de apoyo.**

**1.6.3.1.- Oxígeno terapia domiciliaria.**

**1.6.3.2.- Programas de ejercicio.**

**1.6.3.3.- Dieta.**

**1.6.4.- Trasplante pulmonar.**



**1.6.5.- Posibilidades en el futuro del tratamiento médico.**

**1.6.5.1.- Inhibidores de las citoquinas.**

**1.6.5.2.- Inhibidores de los factores de crecimiento.**

**1.6.5.3.- Agentes antifibrosantes.**

**1.6.5.4.- Nuevos agentes antiinflamatorios.**

**1.6.1.- Tratamiento etiológico.**

Obviamente el tratamiento etiológico se podría considerar como el ideal. El problema radica en que en muchos casos se desconoce el agente causal o el diagnóstico se realiza cuando las lesiones están lo suficientemente avanzadas como para que, aún retirando al paciente del agente agresor, la enfermedad progrese hacia la incapacidad o muerte.

**1.6.2.- Tratamiento sintomático.**

**1.6.2.1.- Agentes antiinflamatorios.**

1) Corticoides:

Los esteroides a altas dosis, generalmente en la forma de prednisona oral, constituyen el tratamiento más utilizado para las enfermedades fibrosantes del pulmón (*Hunninghake G et al., 1995; Selman M, 1996; Xaubet A et al., 2000; Khalil N et al., 2004; Talmadge E, 2005*).

La respuesta al tratamiento varía enormemente y suele ser buena en sarcoidosis y formas tempranas de neumonitis por hipersensibilidad (*Selman M, 1996; Khalil N et al., 2004*). En el caso de la FPI, se ha comprobado que los respondedores no llegan al 20% y que solo un 10-20%

mejoran la función respiratoria (*Winterbauer RH, 1991*). En estos casos, la mejoría suele ser rápida, y alcanza un máximo entre uno y tres meses. Posteriormente, el paciente puede mejorar ligeramente o permanecer estable por tiempo indefinido. Mucho de los enfermos de este subgrupo de respondedores, comienzan a empeorar progresivamente después de uno o dos años (*Sueiro A et al., 1998*).

El fármaco puede suspenderse si el paciente cura, o mantenerse definitivamente en la dosis de mantenimiento con incrementos en caso de observarse acción inflamatoria. Si el paciente empeora lenta e inexorablemente a pesar del uso esteroideo, es conveniente suspenderlos (*Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*).

La presencia de complicaciones (hipertensión arterial, osteoporosis, alteraciones del metabolismo glicídico...), obligan a suspender el tratamiento hasta en un 10% de los casos (*Alvarez-Sala R et al., 1993*).

Se ha estudiado, la utilización de corticoides inhalados (beclometasona) en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad crónica con resultados alentadores (similares a los corticoides orales) (*Kirstein D, 1995*).

## 2) Azatioprina, ciclofosfamida y ciclosporina A.

En general se usan en combinación con esteroides. Cuando se han usado como tratamiento único exclusivo, se ha tratado en general de enfermos con fibrosis casi preterminal y/o con graves complicaciones

sistémicas por el uso de esteroides (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Selman M, 1996; Khalil N et al., 2004*).

La ciclofosfamida es un agente alquilante derivado de la mostaza nitrogenada que produce una depleción linfocitaria (*Sueiro A et al., 1998*). Parece ser que los mejores resultados se obtienen en las fases más tardías de la enfermedad, cuando predominan los eosinófilos en el líquido del LBA. La dosis recomendada es 100 mg de ciclofosfamida al día asociada a 20 mg de prednisona. Las complicaciones más habituales de este fármaco son: neutropenia, trombocitopenia, cistitis hemorrágica y azoospermia, entre otras (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Selman M, 1996; Sueiro A et al., 1998; Xaubet A et al., 2000; Talmadge E, 2005*).

La azatioprina tiene las mismas indicaciones que la ciclofosfamida, aunque con menor efectividad que ésta, si bien los efectos secundarios son más controlables. La dosis recomendada de azatioprina es aproximadamente de 2 mg/Kgr/día, sin exceder de 200 mg/día. Las complicaciones más habituales son: alteraciones gástricas, insomnio, intolerancia a la glucosa y supresión de la médula ósea (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Sueiro A et al., 1998; Khalil N et al., 2004*).

La ciclosporina A parece obtener una buena respuesta inicial, pero ésta no es mantenida a lo largo del tiempo (*Sueiro A et al., 1998*).

### 3) Antioxidantes.

Serán considerados ampliamente en apartados posteriores.

### **1.6.2.2.- Agentes antifibrosantes.**

Se han ensayado diferentes fármacos que inhiben la fibrogénesis no obteniéndose resultados significativos hasta el momento (*Hunninghake G et al., 1995; Sueiro A et al., 1998; Selman M, 2004*). Entre los principales agentes antifibrosantes se encuentran:

#### 1) D-Penicilamina.

La D-Penicilamina parece interferir en la formación de uniones covalentes intra e intermoleculares de las fibras de colágenas, inhibiendo de esta forma el desarrollo de la fibrosis pulmonar (*Ward WF, 1983*). Sin embargo, en fibrosis pulmonar humana los resultados a largo plazo no han sido prometedores (*Selman M, 1996; Selman M et al., 2004*).

Sus principales efectos adversos incluyen bronquiolitis, nefrotoxicidad, leucopenia, trombocitopenia, alteraciones del nervio óptico y hepatitis entre otras.

#### 2) Colchicina.

Esta droga sería teóricamente un agente ideal para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, dados sus importantes efectos antifibrogénicos y sus relativamente menores efectos tóxicos colaterales. Los mecanismos de acción de la colchicina incluyen, por un lado, la disminución de la secreción de colágena y, por otro, el aumento de la actividad fibrolítica. In vitro, parece inhibir la liberación de factores que inducen la proliferación de fibroblastos por parte de los macrófagos alveolares (*Peters SG, 1993*;

*Selman M, 1996; Selman M et al., 2004*). La dosis más empleada es de 0.6-1.2 mg/día utilizada al menos durante 6 meses (*Sueiro A et al., 1998*).

Se requiere todavía de más estudios multicéntricos que establezcan su eficacia (*Peters SG, 1993*).

### 3) Captopril.

El captopril es un análogo de la prolina que se usa en clínica como inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. Recientemente se está empleando en modelos experimentales como agente antifibrosante.

#### **1.6.2.3.- Otras drogas.**

En el manejo de estos pacientes se usan habitualmente otros fármacos para prevenir posibles efectos secundarios de la inmunosupresión (antibióticos, tuberculostáticos), así como medicamentos para mejorar la ya deteriorada función pulmonar ( $\beta_2$ -inhalados).

#### **1.6.3.- Tratamiento de apoyo.**

Los pacientes con enfermedades fibrosantes del pulmón deberían recibir una serie de “medidas de apoyo” que les ayudaran a aumentar su calidad de vida. Entre estas medidas se encuentran:

### **1.6.3.1.- Oxigenoterapia domiciliaria.**

Esta medida mejora la PaO<sub>2</sub> en reposo y con el ejercicio y, aunque no está demostrado, podría aumentar la supervivencia de este tipo de pacientes.

### **1.6.3.2.- Programas de ejercicio.**

Ayudan a mantener la fuerza muscular y favorecen la posibilidad de realizar actividades relativamente normales en la vida cotidiana.

### **1.6.3.3.- Dieta.**

Se requiere para minimizar el sobrepeso con el uso de esteroides y maximizar la nutrición cuando la disnea dificulta la alimentación normal. Además es importante en relación al consumo de oxígeno.

### **1.6.4.- *Trasplante pulmonar.***

Un avance importante en el manejo de los pacientes con fibrosis pulmonar lo constituyó la posibilidad de realización del trasplante pulmonar.

El primer trasplante de pulmón se realizó en 1905 con poco éxito, parece ser que debido a la pobre técnica usada y al escaso conocimiento que se tenía sobre la inmunología del pulmón. El progreso en las técnicas quirúrgicas y en especial el advenimiento de la ciclosporina A, un potente inhibidor de la actividad funcional de los linfocitos T facilitadores,

trasformó este procedimiento experimental en algo relativamente rutinario (*Sueiro A et al., 1998*).

Siguiendo las recomendaciones de la SEPAR; las indicaciones más idóneas para la realización de un trasplante pulmonar en este tipo de enfermedades intersticiales fibrosantes del pulmón son (*Sueiro A et al., 1998*):

- \*Fibrosis pulmonar avanzada con escasa expectativa de vida (<2 años).
- \*Edad inferior a 65 años.
- \*Insuficiencia respiratoria en clase funcional III-IV.
- \*Actividad diaria muy limitada.
- \*Tratamiento médico ineficaz y sin alternativas.
- \*VC<30% del teórico; hipoxemia, hipertensión pulmonar secundaria.
- \*Función cardíaca aceptable (ausencia de cardiopatía isquémica).
- \*Adecuado estado nutricional.
- \*Status psicosocial adecuado.
- \*Ausencia de contraindicaciones (enfermedades malignas, tabaquismo activo, drogodependencia, otras.).

Se estima que la supervivencia post-trasplante de los pacientes con fibrosis pulmonar se encuentra sobre un 65-70% en el primer año y un 40% a los cinco años. Probablemente se obtengan mejores cifras de supervivencia cuando se mejoren los criterios de selección de los donantes (muy escasos) y de los receptores, los métodos de diagnóstico de rechazos e infecciones y los esquemas de tratamiento inmunosupresor (*Mal H et al., 2005*).

Los principales factores que afectan la supervivencia a corto plazo son el rechazo agudo, el rechazo agudo persistente, las infecciones virales, bacterianas y micóticas; y a largo plazo, la bronquiolitis obliterante cuya etiología se desconoce, pero que ha sido interpretada como una forma de rechazo crónico (*Mal H et al., 2005*).

El cuanto al tipo de trasplante, parece de elección el trasplante unipulmonar, reservando el bilateral a los casos en los que existan dudas razonables sobre el comportamiento postrasplante del pulmón residual y el cardiopulmonar cuando el paciente sea joven (<50 años) y se encuentre en insuficiencia cardíaca clínica (*Alvarez-Sala R et al., 1993; Sueiro A et al., 1998; Mal H et al., 2005*).

En los últimos años, ha surgido la duda acerca de si existen o no recidivas de la enfermedad primaria que dio lugar al trasplante. Esta posibilidad parece poco frecuente, aunque será necesario esperar un mayor periodo de tiempo y un mayor número de pacientes trasplantados para conocer la dimensión real del problema (*Selman M, 1996*).

#### **1.6.5.- Posibilidades en el futuro del tratamiento médico.**

En la medida en que se conozca más acerca de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la patogénesis de la inflamación y fibrosis pulmonar, se objetivaran nuevas posibilidades terapéuticas. Entre las formas de terapia que se pueden considerar como “futuribles” estan:

##### **1.6.5.1.- Inhibidores de las citoquinas.**

##### **1.6.5.2.- Inhibidores de los factores de crecimiento.**



**1.6.5.3.- Agentes antifibrosantes.**

**1.6.5.4.- Nuevos agentes antiinflamatorios.**

Únicamente haremos mención de los mismos, dado que exceden el propósito de este trabajo de investigación.

Otra alternativa para el tratamiento de la fibrosis pulmonar en un futuro no muy lejano: la terapia génica.

## **2.- RADICALES LIBRES Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES.**

Las reacciones donde intervienen oxidantes y radicales libres han jugado un papel esencial en el origen de las formas de vida aerobias y son una parte integral de la homeostasis celular. Sin embargo, y debido a los efectos tóxicos colaterales de esta presión oxidativa, se desarrollaron, de forma muy temprana en la evolución, los enzimas y factores antioxidantes que son capaces de controlar la presencia y los efectos de estos productos. Oxidantes y antioxidantes tienen una clara función en el organismo y un desequilibrio en este delicado balance puede acarrear muchas alteraciones bioquímicas y celulares que pueden crear condiciones patológicas.

### **2.1.- CONCEPTO DE RADICAL LIBRE.**

Los radicales libres pueden ser definidos como especies químicas, moléculas o átomos, capaces de existir independientemente con uno o más electrones desapareados en su última capa u orbital electrónico, es decir, con un número impar de electrones (*Halliwell B et al., 1992; Cheeseman KH et al., 1993*). Pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros.

La existencia del electrón desapareado, es lo que le confiere su altísima reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que tiende rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable. Esto hace que su vida media sea muy corta, con la consiguiente dificultad para su estudio.

En los sistemas biológicos, los radicales libres se están formando continuamente, algunos ejemplos de estos son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y

el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ), radicales centrados en el oxígeno, el radical triilo ( $\text{RS}^\cdot$ ), radical centrado en el azufre, el triclorometilo ( $\text{CCl}_3^\cdot$ ), radical centrado en el carbono y formado por el metabolismo del  $\text{CCl}_4$  en el hígado, etc. (Halliwell B et al., 1992). En la tabla 1 se muestran algunos radicales libres y las moléculas sobre las que actúan predominantemente.

Radical	Nombre	Moléculas diana
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superóxido	Enzimas
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$\text{HO}^\cdot$	Hidroxilo	Todas las moléculas
$\text{R}^\cdot$	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
$\text{RO}^\cdot$	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
$\text{ROO}^\cdot$	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
$\text{ROOH}$	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete	Distintas moléculas
$\text{NO}^\cdot$	Nitroxilo	Distintas moléculas
$\text{CCl}_3^\cdot$	Triclorometilo	Oxígeno

Tabla 1.- Ejemplo de radicales libres y especies reactivas del oxígeno.

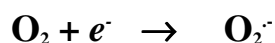
Siempre que un radical da un electrón “a”, toma un electrón “de” o simplemente se une a una molécula no radical, ésta se transforma en radical (Romero D et al., 1989; Halliwell B, 1989; Ballester M et al., 1996). Normalmente se producen reacciones en cadena, así un radical produce otro y éste otro, etc. Sólo cuando dos radicales se unen, desaparecen como tales radicales (Romero D et al., 1989; Halliwell B et al., 1992; Ballester M et al., 1996).

En los organismos vivos, los oxidantes y radicales libres más abundantes y reactivos son los centrados en el oxígeno. Dichos radicales se agrupan dentro del término genérico de “especies reactivas del oxígeno” (ERO), haciéndose referencia con este término, a un conjunto de moléculas que incluyen no sólo a los radicales de oxígeno propiamente dichos, entre los que se encuentran el  $O_2^-$  y el  $HO^\cdot$ , sino también a algunas moléculas, no radicales, derivadas del oxígeno e involucradas directamente en la producción de radicales del oxígeno, como puedan ser el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el ácido hipocloroso (ClOH) (Romero D et al., 1989; Casado JA et al., 1996; Ballester M et al., 1996; Peña de la A et al., 1997).

Como consecuencia de la formación continuada de radicales libres, debe existir en el organismo un adecuado sistema no sólo de defensa antioxidante sino también de reparación del daño oxidativo producido (Fridovich I, 1989).

### **2.1.1.- Radical superóxido.**

Se trata de un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente o monoeléctrica del oxígeno molecular.



Es una especie menos reactiva que otros radicales como pueda ser el  $HO^\cdot$  y aunque su participación en procesos citotóxicos ha sido observada en algunos estudios (Fridovich I, 1976; McCord JM, 1969), no parece ser un agente citotóxico que actúe directamente, sino que su principal efecto sería

el de actuar como fuente de  $H_2O_2$  u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (*Cheeseman KH et al., 1993*).

La principal fuente de producción de anión superóxido se encuentra en la cadena de transporte mitocondrial, ya que de un 5 a un 10% del oxígeno consumido es prácticamente reducido por electrones provenientes de los transportadores de dicha cadena (*Borevis A et al., 1973; Kass GEN et al., 1993*). Así, la ubisemiquinona parece ser la responsable de cerca del 75% de superóxido formado por esta vía (*Borevis A et al., 1975*) y la NADH deshidrogenasa la productora del resto (*Romero D et al., 1989; Turrens JF et al., 1990; Kass GEN et al., 1993*).

Entre otras fuentes nos encontramos, el escape de electrones del citocromo  $P_{450}$  en el retículo endoplasmático hepático, la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc., o como productos durante los procesos de fagocitosis en la respuesta inflamatoria, o reacciones como las catalizadas por xantina oxidasa y aldehído oxidasa (*McCord JM, 1989; Ballester M et al., 1996*).

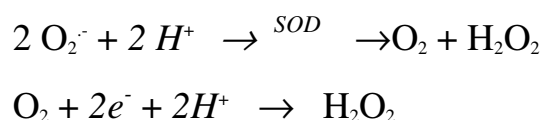
Entre sus actividades, se ha observado su función como vasoconstrictor en células del músculo liso (*Laurindo FRM et al., 1991*).

A pH bajo el anión superóxido podría protonarse, transformándose en el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), siendo esta forma protonada más reactiva y capaz de generar lipoperoxidación, "in vitro", al poder reaccionar directamente con ácidos grasos poliinsaturados libres, aunque "in vivo" se ha demostrado que su tendencia es reaccionar con lipoperoxidos ya formados dando lugar a radicales peroxilo (*Bielski BHJ, et al., 1983*). Sin

embargo, a pH fisiológico menos del 1% del superóxido se encuentra en su forma protonada (*Cheeseman KH et al., 1993*).

### **2.1.2.- Peróxido de hidrógeno.**

Es un metabolito del oxígeno intracelular, formado por una dismutación del anión superóxido (catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), o directamente a través de la reducción bivalente de oxígeno.



El  $\text{H}_2\text{O}_2$  al igual que el anión superóxido, presenta una reactividad química limitada, pero su capacidad para atravesar membranas y el hecho de poder generar, en presencia de iones metálicos de transición o del  $\text{O}_2^-$ , el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), hace que se incluya dentro del término genérico de “ERO”, a pesar de no ser en sí un radical libre ya que no presenta electrones desapareados.

En mitocondrias, en condiciones fisiológicas, se ha estimado una producción de 0.3 a 0.6  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$  de proteína, pudiéndose incrementar dicha producción con un aumento de  $\text{PO}_2$  en el medio, lo que implica al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el efecto letal inducido por altas presiones de este gas (*Chance B et al., 1979*).

Se ha observado que pequeñas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producen lisis eritrocitaria, asimismo pueden producir la oxidación directa de compuestos sulfidrilos, tales como residuos de metionina de diversas proteínas e inducir indirectamente la peroxidación de los ácidos grasos de

las membranas celulares (*Halliwell B et al., 1984*). Asimismo, se ha demostrado la inducción de la producción del factor activador plaquetario por el endotelio en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Redl H et al., 1993*).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene la capacidad de atravesar las membranas biológicas, pudiendo causar o promover el daño oxidativo en macromoléculas distantes de su lugar de producción (*Chance B et al., 1979*).

### **2.1.3.- Radical hidroxilo.**

Es el radical más reactivo entre las especies oxigenadas conocidas, capaz de reaccionar, de modo directo, con prácticamente cualquier molécula biológica.

En su producción radica, en la mayoría de los casos, la citotoxicidad de los radicales  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que, como se ha comentado, estas moléculas presentan una baja reactividad.

En los organismos vivos, la principal fuente de producción del radical hidroxilo, parece ser la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente el hierro y cobre. Siendo en el caso del hierro a través de la denominada reacción de Fenton (*Halliwell B et al., 1986; Minotti G et al., 1987; Anuoma OI et al., 1991; Casado JA et al., 1996*).

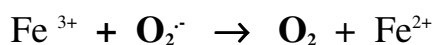


La producción de hidroxilo puede estimularse por el anión superóxido, mediante la denominada reacción de Haber-Weiss o también

denominada en algunos casos reacción de Fenton conducida por el  $O_2^{\cdot-}$  (Halliwell B et al., 1986; Halliwell B et al., 1992; Casado JA et al., 1996).



La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de la reacción de Fenton con la capacidad del anión superóxido para reducir metales iónicos de transición.



Hay otras vías de producción de radical hidroxilo en organismos vivos, entre los que se encuentran la fisión homolítica del agua provocada por excesiva exposición a radiaciones ionizantes (Von Sonntag C, 1987) o bien la descomposición de peroxinitrilo, independiente de metales iónicos de transición (Beckman JS et al., 1990). En esta última vía también interviene el anión superóxido, ya que es el causante de la formación de radical peroxinitrilo al reaccionar con el óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), especialmente en fagocitosis y células endoteliales vasculares (Saran M et al., 1989).

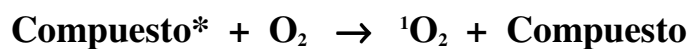
#### **2.1.4.- Oxígeno singlete.**

No se trata de un radical en sí, pero junto al radical hidroxilo, es considerada como una de las especies oxigénicas capaces de reaccionar directamente con macromoléculas como puedan ser ácidos grasos (Sevanian A et al., 1985; Halliwell B et al., 1993).

Es producido por absorción de energía por una molécula de oxígeno, lo que causa una nueva disposición de los electrones como consecuencia

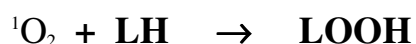


del cambio de orientación de uno de sus espines. La vía más importante de producción en sistemas biológicos se da cuando ciertos compuestos son iluminados en presencia de oxígeno, estos compuestos absorben la luz, adquiriendo un estado de alta excitación electrónica, y transfiriendo ese exceso de energía al oxígeno con lo que se convierte en oxígeno singlete (*Halliwell B et al., 1993*).



Entre estos agentes fotosensibles nos encontramos colorantes (p.ej. eosina), cierto tipo de drogas (p. ej. tetraciclinas) y una serie de sustancias encontradas en el cuerpo humano, como pueden ser porfirinas, riboflavinas y bilirrubina (*Halliwell B et al., 1993*). Así, por ejemplo, en pacientes con cierto tipo de porfiria, se produce acumulación de porfirinas que puede provocar daños en la piel, al interactuar la luz solar con ellas dando lugar a la formación de oxígeno singlete (*Krinsky NI, 1993*).

A pesar de la capacidad del oxígeno singlete para reaccionar con ácidos grasos, no se puede considerar como un inductor de la peroxidación lipídica, como pueda serlo el OH $\cdot$ , puesto que reacciona directamente con el ácido graso para dar peróxidos, sin que exista sustracción de hidrógeno, no dándose por lo tanto las reacciones en cadena (*Halliwell B et al., 1993*; *Frankel EN, 1984*).

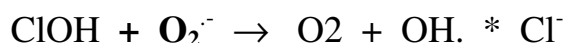


La reacción de peróxidos entre sí, pueden producir oxígeno singlete, siendo esta otra vía de producción, aunque menor, puesto que la probabilidad de colisión entre estos peróxidos es baja.

Otra vía de producción es la observada por Kanofsky JP et al. (1991), en la que la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas produce oxígeno singlete.

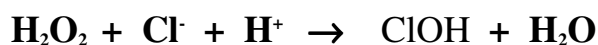
### **2.1.5.- Ácido hipocloroso.**

Al igual que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, el ácido hipocloroso no se puede considerar un radical libre en sí, pero se incluye dentro del término ERO, por su capacidad para oxidar importantes moléculas biológicas así como producir e interaccionar con otros radicales.



Puede atacar grupos sulfidrilo (-SH) de ciertos residuos aminados de proteínas como puede ser el caso de la alfa-1 antiproteasa pulmonar.

Este compuesto es formado por la acción de la mieloperoxidasa sobre iones cloruro en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reacción que tiene lugar en las vacuolas fagocíticas de los neutrófilos tras su fusión con las vesículas de lisosomas que contienen mieloperoxidasa (*Flitter WD, 1993*).



## **2.2.- BALANCE Y ESTRÉS OXIDATIVO.**

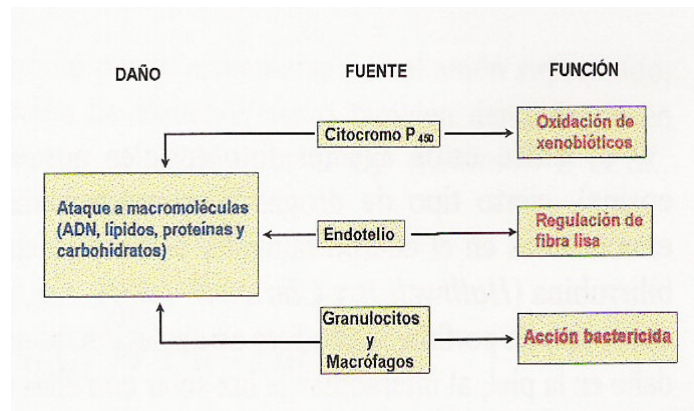
Como se ha comentado previamente, los radicales libres se están formando continuamente en el organismo, presentando este un adecuado sistema de protección para eliminar y/o reparar el daño producido por estos compuestos.

Sin embargo, estas defensas antioxidantes no son efectivas al 100% (*Halliwell B et al., 1993*), debido a que estas especies químicas son en muchos casos sintetizadas deliberadamente por el organismo, estando implicadas en numerosos procesos metabólicos y cumpliendo por tanto una función biológica. Así, en estudios realizados con animales transgénicos se ha observado el potencial efecto deletéreo de un exceso de SOD en ciertos tejidos (*Groner Y et al., 1990; Scott MD, 1989*).

Algunos enzimas utilizan radicales libres en sus centros activos durante los procesos de catálisis, como por ejemplo en la ribonucleótido reductasa (*Stubbe J, 1990*). Pueden ser generados por fagocitos como parte de su papel bactericida (*Babior BM, 1978*), o encontrarse involucrados en la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas, en procesos de detoxificación de xenobióticos, en procesos de maduración, como por ejemplo la maduración de reticulocito a eritrocito (*Sevanian A et al., 1985*), etc.

Por lo tanto es necesario que exista un tenue balance entre las propiedades fisiológicas de los radicales libres y sus propiedades dañinas, por ejemplo bajas concentraciones de hidroperóxidos lipídicos podrían activar las enzimas lipooxigenasa y ciclooxigenasa afectando así la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos in vivo, mientras que altas

concentraciones podrían inactivarlas (*Halliwell B et al., 1993*). En la figura 1 se representa esta dualidad de funciones.



*Figura 1.- Dualidad de funciones de algunos radicales libres.*

Son los sistemas antioxidantes los encargados de mantener el equilibrio adecuado entre estas funciones, dando lugar a lo que se conoce como “balance oxidativo”. Cuando este balance, bien por exceso de producción de radicales libres o bien por disminución de las defensas antioxidantes, se desequilibra hacia las propiedades dañinas de los radicales libres se produce el “estrés oxidativo”, lo cual puede repercutir en un daño en el tejido directo o indirecto, siendo la importancia del daño dependiente de la duración y de la naturaleza del sistema estresado.

El estrés oxidativo, o más bien el exceso de radicales libres, esta involucrado en mayor o menor grado en múltiples enfermedades. Se mantiene hoy en día, la ambigüedad desatada a mediados de los 80, acerca de si es el estrés oxidativo el causante del daño celular, o más bien el daño celular el causante del estrés oxidativo por aumento de los radicales libres de forma secundaria, inclinándose esta ambigüedad, en la mayoría de las patologías en las que los radicales libres actúan en mayor grado, hacia la primera suposición (*Orrenius S et al., 1989; Coghlan JG, 1991*). En la tabla 2, se detallan algunas de estas patologías.

Infarto agudo de miocardio	Pulmón del ozono
Fibrinólisis	Pancreatitis
Angioplastia coronaria (ACTP)	Esofagitis
Cardioplejia	Artritis reumatoide
Transporte y preservación de órganos	Preeclampsia
Isquemia intestinal	Cáncer cervical
Isquemia cerebral	Degeneración alcohólica del hígado
Necrosis tubular aguda	Diabetes
Enteritis	Pancreatitis
Deficiencias inmunitarias	Síndrome de Down
Colagenosis	Síndrome de Batten
Arteriosclerosis	Aterosclerosis
Deficiencia de mieloperoxidasa	Cataratas
Enfermedad granulomatosa crónica	Tumores
Enfisema	Envejecimiento
Hiperreactividad bronquial	Shock, etc.

Tabla 2.- Ejemplo de las múltiples patologías en las que se observa la implicación, en mayor o menor medida de radicales libres.

### 2.3.- FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.

Como se ha comentado previamente, en el organismo se están produciendo de un modo continuado radicales libres, ya sea de manera deliberada, cumpliendo funciones fisiológicas, o accidental, siendo algunas de las vías más importantes de producción las comentadas a continuación.

#### 2.3.1.- Cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Bajo condiciones fisiológicas normales, ésta puede ser considerada como la mayor fuente de producción de radicales libres de forma accidental.

Del total del oxígeno que llega a la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el 90 al 95% del mismo es metabolizado a agua mediante la vía de la reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos.



Sin embargo, el 5-10% del oxígeno consumido sufre una reducción monovalente por electrones provenientes de los transportes de la cadena que escapan al control de la misma, sobre todo en situaciones de daño mitocondrial, dando lugar a la formación de anión superóxido (*Borevis A et al., 1973; Romero D et al., 1989; Kass GEN et al., 1993*), el cual rápidamente se dismuta, por acción de la superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno (*Borevis A et al., 1975*), con la consecuente formación posterior de radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss (*Halliwell B et al., 1986; Casado JA et al., 1996*).

Se han observado dos sitios principales en la formación de estos radicales libres, uno es el paso de ubiquinona hacia citocromo C1, donde el intermediario semiubiquinona es capaz de reducir el oxígeno a anión superóxido, siendo este paso el responsable de prácticamente el 75% del anión formado (*Borevis A et al., 1975*); el otro paso es a nivel de la NADH deshidrogenasa (*Turrens JF et al., 1990*).

La producción de superóxido por esta vía aumenta principalmente bajo dos condiciones físicas, una de estas vías, es cuando la concentración o consumo de oxígeno se encuentra incrementado, como puede ser por ejemplo en el caso de la actividad física (*Litarru GP, 1994*), en la que el consumo de oxígeno puede aumentar de 10 a 40 veces con respecto al estado de reposo (*Aw TY et al., 1986*). La otra vía, se da cuando la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como puede suceder durante el periodo de isquemia y posterior reperusión (*McCord JM, 1989; Flitter WD, 1993*).

### **2.3.2.- Xantina oxidasa.**

Se trata de una enzima encargada de catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, acoplando a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular, con la consiguiente formación del anión superóxido (*Ballester M et al., 1996*).

En condiciones fisiológicas normales se encuentra en su forma nativa, xantina deshidrogenasa, la cual utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones, no teniendo lugar por lo tanto la reducción de oxígeno molecular ni la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. En tejidos sanos el porcentaje del enzima en su forma oxidada es muy bajo, habiéndose observado en algunos estudios un valor aproximado de un 10%, aunque este porcentaje podría ser debido a intermediarios proteolíticos, creados durante la degradación normal de la proteína en la célula (*Roy RS et al., 1983*).

Sin embargo, durante alteraciones de los mecanismos homeostáticos celulares, como puede suceder en isquemia o hipoxia (figura 2), tiene lugar un gran aumento en la conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, aumento consecuente de un incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular y activación de determinadas proteasas. La proporción y mecanismo de transformación de xantina deshidrogenasa a oxidasa podría ser específica del tejido en la que tiene lugar (*Roy RS et al., 1983*), pudiendo ser convertida por una proteólisis limitada (*Battelli MG et al., 1972*), o por oxidación de grupos tioles (*Della Corte E et al., 1972*).

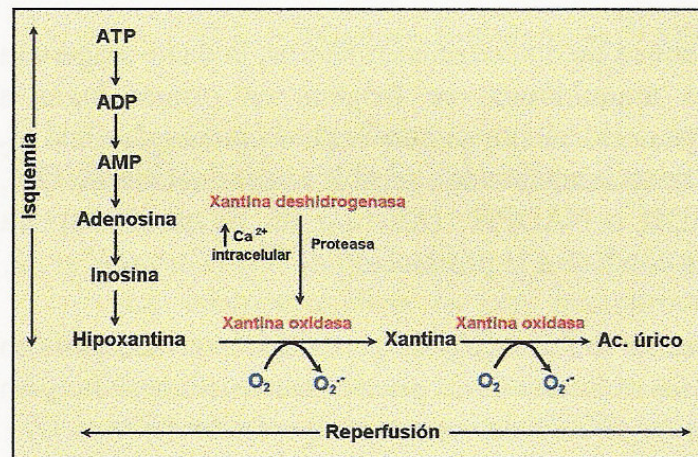


Figura 2-. Esquema del mecanismo de generación de anión superóxido por xantina oxidada durante isquemia/repercusión.

En numerosos estudios se ha observado la participación de esta fuente de producción de radicales en distintas patologías o daños fisiológicos, como por ejemplo en la isquemia/repercusión (*Granger DN et al., 1981; Friedl HP et al., 1990*), síndrome de distrés respiratorio del adulto (*Grum CM et al., 1987*), shock hemorrágico o traumático (*Redl H et al. 1993*), etc., observándose en todas ellas degradación del pool de nucleótidos de adenina, degradándose el ATP a hipoxantina y xantina, aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aumento de ácido úrico consecuente de la actividad de la xantina oxidasa, etc. El ejercicio físico intenso presenta similitud con las observaciones anteriores, por lo que en esta situación también podría actuar esta vía de producción de radicales libres (*Sjodin B et al., 1990*).

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre este enzima, sigue existiendo controversia acerca de su papel real en ciertas patologías, controversia basada en las marcadas diferencias, tanto en la distribución como en la concentración de la misma en los distintos modelos animales



usados, observándose por ejemplo una gran actividad de xantina oxidasa en ratas, perros y ratones mientras que en conejos, cerdos y humanos se ha mostrado una muy pequeña actividad de la misma (*De Jong JW et al., 1990*).

### **2.3.3.- Metabolismo del ácido araquidónico.**

La síntesis de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico se puede convertir en una fuente de radicales libres, encontrándose en el endotelio vascular una gran fuente de radicales generados por esta vía.

Sobre el ácido araquidónico ejercen su acción catalítica dos enzimas, la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa. Vía ciclooxigenasa, el araquidónico sufre una primera oxigenación que da lugar a la prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), la cual por acción de la prostaglandina H<sub>2</sub> sintetasa da lugar a la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), etapa en la que se puede generar O<sub>2</sub><sup>-</sup>, si hay disponibilidad de NADH o NADHP (*Kukeja RC et al., 1986*). La vía lipooxigenasa parece estar involucrada en la síntesis de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (*Durán N et al., 1984*).

Este metabolismo se encuentra estimulado en situaciones fisiológicas en las que tiene lugar un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, como es el caso de la isquemia/reperfusión, en la que se estimula la actividad de las fosfolipasas calcio dependientes, entre las que se encuentra la fosfolipasa A<sub>2</sub>, responsable de la liberación de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, incluyendo el ácido araquidónico (*Bersohn MM et al., 1982*).

Igualmente, hay que destacar la formación de peróxidos intermediarios en ambas vías, los cuales junto a los radicales libres pueden incrementar el daño en situaciones patológicas, como en el caso de la isquemia/reperfusión (*Flitter WD, 1993*).

#### **2.3.4.- Formación de radicales por células fagocíticas.**

Las células fagocíticas generan radicales libres, entre los que se encuentran el  $O_2^-$ , como parte de su papel antibactericida y aunque estos radicales son formados en el entorno de la membrana plasmática que engloba a la bacteria, es inevitable que escape alguno de estos radicales.

Neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares, poseen en su membrana el sistema flavoproteico citocromo b254-NADPH oxidasa, sistema productor de radicales libres. Así, durante la actividad fagocitaria se produce un incremento en el consumo de oxígeno, en el denominado “estallido respiratorio”, siendo entre un 70 y 90% de este oxígeno utilizado en la producción de  $O_2^-$ , vía producción de NADPH a partir de hexosa monofosfato (*Romero D et al., 1989; Kass GEN et al., 1993; Winrow VR et al., 1993; Casado JA et al., 1996*).



A partir de este  $O_2^-$ , se produce una cascada de radicales libres, ya que rápidamente dismuta a  $H_2O_2$ , el cual es sustrato de la mieloperoxidasa para la formación de HClO.

La presencia de iones metálicos de transición puede dar lugar a la formación de radical hidroxilo. Estos iones metálicos, aunque normalmente

no están libres en los sistemas biológicos, en determinadas situaciones fisiológicas como es el caso de fagocitosis e inflamación, el pH bajo puede ayudar a la liberación de los mismos (*Winrow VR et al., 1993*).

Uno de los radicales libres formados durante los procesos de fagocitosis es el óxido nítrico (NO $\cdot$ ), este radical muestra un importante efecto citotóxico en la defensa contra células tumorales, hongos, parásitos, protozoos, helmintos y micobacterias (*Moncada S et al., 1991*). Su reacción con el O $_2^-$  da lugar a peroxinitrilos los cuales por descomposición dan lugar a OH $\cdot$ .

El NO $\cdot$  es generado en un proceso NADP-dependiente (sintetizado a partir de la arginina), actuando en la regulación de la presión sanguínea al ser un potente vasodilatador (*Kolb H et al., 1992*).

La peligrosidad del daño a membranas por escape de radicales libres durante los procesos de fagocitosis, se ve aumentada por una subida durante este proceso del metabolismo del ácido araquidónico, cuya liberación de las membranas se incrementa durante la fagocitosis.

### ***2.3.5.- Metabolismo de las catecolaminas.***

Se ha observado que en situaciones de alteraciones fisiológicas, como es el caso de la isquemia/reperfusión, la autooxidación de las catecolaminas puede causar daño miocárdial, mediante la generación de radicales libres (*Singal PK et al., 1993*).

Durante la isquemia/reperfusión y otras situaciones aumenta la cantidad de catecolaminas circulantes, en parte debido a la liberación

miocárdica, mostrándose que durante su degradación espontánea y mediada por monoaminooxidasas o catecol-o-metiltransferasa son capaces de ofertar electrones para la formación de radicales libres, siendo sólo una fuente de radicales libres en estados patológicos, ya que su producción de oxidación a pH fisiológico es muy bajo (*Jewett SL et al., 1989*).

### **2.3.6.- Citocromo P450.**

El sistema NADPH/NADPH citocromo P450, es un sistema capaz de reducir ciertos compuestos en una reducción monovalente, generando radicales libres. Así, en la eliminación de xenobióticos y compuestos químicos extraños, mediante la actuación del citocromo P450 tiene lugar la formación de radicales libres.

En numerosos estudios se ha observado la participación de este sistema en la generación de radicales, así, en células tipo II alveolares la reducción del paraquat (potente herbicida) por este sistema da lugar a la formación del radical catión paraquat, que reacciona rápidamente con el oxígeno molecular, formando  $O_2^-$  (*Ryrfeldt A et al., 1993*).

Un estudio pionero que implicaba directamente a los radicales libres en el daño al hígado es la eliminación del tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ), a nivel del citocromo P450 microsomal hepático, con la formación del radical triclorometilo ( $CCl_3^{\cdot}$ ), radical que reacciona con el oxígeno, dando lugar al radical triclorometiloperóxido ( $CCl_3O_2^{\cdot}$ ) (*Slater TF, 1984*). También en hígado, la eliminación de etanol o alcohol por el citocromo P450 da lugar a la formación de radical hidroxietilo ( $CH_3\text{-CHOH}$ ) (*Poli G, 1993*).

### **2.3.7.- Contaminantes atmosféricos.**

La inhalación del aire que nos rodea nos expone a múltiples radicales y polucionantes, entre los que se encuentran el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) (radical libre generado en la combustión de carburantes fósiles), el ozono (poderoso agente oxidante), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), etc.

El humo del tabaco es una peligrosísima fuente de radicales libres, conteniendo altas concentraciones de óxidos del nitrógeno, especialmente óxido nítrico, radicales peroxilo y radicales centrados en el carbono entre otros. Además, en los pulmones de los fumadores se producen grandes acumulaciones de hierro, lo cual potencia el daño de estos radicales.

Exposiciones a estos gases en altas concentraciones producen características lesiones del tracto respiratorio, potenciando este daño la acumulación de macrófagos en estas regiones (*Ryrfeldt A et al., 1993*).

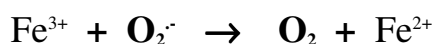
### **2.3.8.- Metales iónicos en la producción de radicales libres.**

Radicales libres como O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han sido mostrados como radicales con baja reactividad directa sobre macromoléculas, centrándose su mayor peligrosidad en la producción de otros radicales mucho más reactivos, como el OH<sup>·</sup>, para lo cual requieren la participación de metales de transición.

Entre estos metales, el hierro ha despertado gran interés, por su abundancia y por su participación en la generación de OH<sup>·</sup>, mediante la clásica reacción de Fenton (*Halliwell B et al., 1986; Casado JA et al., 1996*).



La reacción de Fenton se ve estimulada por agentes reductores, los cuales son capaces de oxidar férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso, ya que el  $\text{Fe}^{3+}$  no es nada reactivo con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entre estos agentes reductores se encuentran el ascorbato y el anión superóxido.



Otro ión metálico que despierta un interés creciente es el cobre, siendo frecuentemente utilizado “in vitro” para estimular la lipoperoxidación de lipoproteínas de baja densidad, aunque necesita la presencia de trazas de peróxidos lipídicos (*Esterbauer H et al., 1989*).



Se ha observado que el cobre “in vitro” estimula más la formación de ERO que puedan causar mas daño a bases del DNA, que el hierro (*Guyton KZ et al., 1993*).

En vista a las actuaciones de los iones metálicos en la formación de radicales libres, un sistema preventivo de la oxidación podría ser la utilización de compuestos que atraparan estos iones, dificultando su encuentro con los radicales libres. De hecho el organismo tiene un perfecto sistema de transporte y almacenamiento de estos iones mediante proteínas

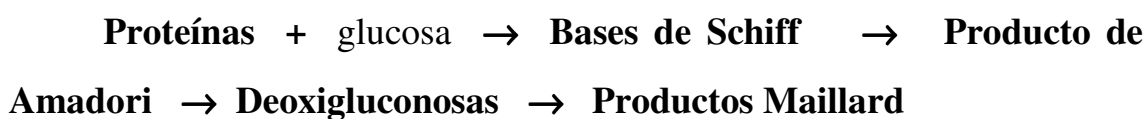
especiales, sin embargo el estrés oxidativo puede liberar iones metálicos de las estructuras que los contiene, por ejemplo, el  $O_2^{\cdot-}$  puede movilizar hierro desde la ferritina y el  $H_2O_2$  puede atacar grupos hemo, liberando el hierro (*Saran M et al., 1990*).

#### **2.4.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES E HIDRATOS DE CARBONO.**

Las interacciones entre radicales libres y azúcares o hidratos de carbono, son interesantes tanto desde el punto de vista bioquímico como desde el punto de vista clínico, al conocerse su implicación en la patología secundaria en la diabetes (*Wolf SP, 1993*), en procesos debidos al humo del tabaco y en general en patologías en las que el ácido hialurónico existe en concentraciones anormales, por ejemplo, enfermedades reumatoides o cataratas, siendo la duración de la interacción determinante de los efectos consecuentes.

Se ha observado que azúcares como glucosa, manitol y desoxiazúcares reaccionan rápidamente con el  $OH^{\cdot}$ . Un ejemplo de reacción con el  $OH^{\cdot}$ , se encuentra en el ácido hialurónico, un glucosaminoglicano constituido por repetidas unidades de ácido glucorónico (un disacárido) y N-acetil-glucosamina, el cual es el encargado de mantener la viscosidad del fluido o líquido sinovial. Cuando este compuesto es expuesto a sistemas productores de radicales libres, se fragmenta (*Greenwald RA et al., 1988*), desestabilizándose el tejido conectivo y produciéndose pérdida de la viscosidad del líquido sinovial. Esta fragmentación es atribuible al  $OH^{\cdot}$ , pero siempre en presencia de metales de transición (*Grootveld MC et al., 1991*).

Por otra parte, los monosacáridos, en condiciones fisiológicas son capaces de reducir el oxígeno molecular, autooxidándose y formando cetoaldehidos e intermediarios oxidantes, como  $O_2^-$ , autooxidación catalizada por metales de transición (*Wolff SP et al., 1984; Wolf SP et al., 1987*). Paralelamente la glucosa es capaz de unirse a proteínas en los grupos amino terminal, iniciando la glicación de las proteínas (*Grandhee SK et al., 1991*), según la reacción:



Estos producto son extremadamente reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (aparición de puentes, entrecruzamientos, acortamientos, cambios conformacionales, etc.), observándose que tanto la autooxidación como la producción de estos productos están íntimamente relacionados a través de la interacción con metales de transición, igualmente, existen evidencias de que los radicales libres e intermediarios oxidantes ( $H_2O_2$ ) de la autoxidación son causa de daño estructural a proteínas expuestas a glucosa in vitro (*Jiang ZY et al., 1990*).

## **2.5.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y PROTEÍNAS.**

Los radicales libres son capaces de atacar residuos aminoácidos de proteínas, dando lugar a entrecruzamientos catalíticos (figura 3), cambios en la conformación y pérdida de funciones (*Winrow VR et al., 1993*). Este daño es rápidamente eliminado por proteasas, evitando la acumulación de proteínas dañadas, existiendo un fino balance entre daño y reparación.



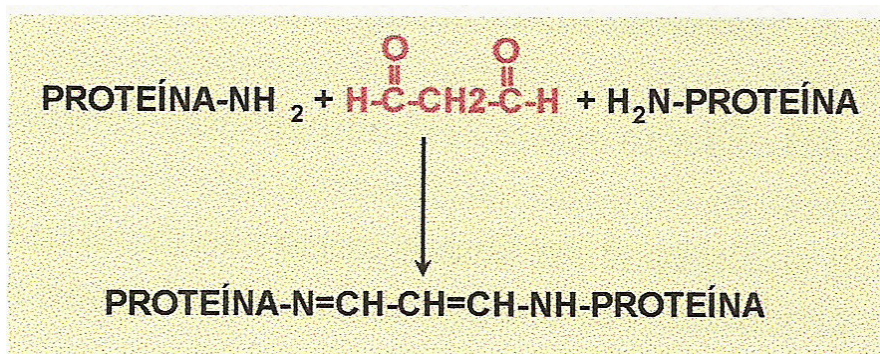


Figura 3.- Entrecruzamiento de proteínas mediado por MDA.

El ataque de radicales libres a proteínas podría ser clasificado en dos categorías (*Litarru GP, 1994*):

\*Ataques difusos, dando lugar a modificaciones generalizadas.

\*Ataques selectivos, dando lugar a modificaciones en sitios específicos.

En las primeras modificaciones se producen ataques en diferentes regiones de la estructura proteica, dando lugar a alteraciones estructurales, agregaciones intra e intercatenarias, fragmentación y/o desnaturalización. Este daño es comúnmente observado como consecuencia de exposiciones a radiaciones ionizantes, ozono o como consecuencia secundaria de cadenas de propagación de radicales libres, entre las que destaca la lipoperoxidación y especialmente la producción de entrecruzamiento catalítico por parte del malondialdehído (*Gillery P et al., 1991*).

Las modificaciones específicas son extremadamente selectivas, siendo los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina los más frecuentemente atacados (*Litarru GP, 1994*). En este tipo de daño

oxidativo juegan un papel importante los metales de transición, siendo las enzimas que contienen dichos metales de transición las que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlas (*Stadtman ER, 1990*). Estas modificaciones son normalmente llamadas “oxidaciones catalizadas por metales” y casi siempre implican cambios covalentes, siendo estas proteínas las más susceptibles a la acción proteolítica de proteasas intracelulares específicas.

Estos ataques oxidativos a proteínas dan lugar, entre otras consecuencias, a alteraciones en la permeabilidad de las células de diferentes tejidos. Así, en células miocárdicas se ha observado una disminución en la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y un incremento en la salida de  $\text{K}^+$ , como consecuencia de ataques oxidativos a ATPasas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (*Ramón JR, 1993*). También se han observado ataques a ATPasas dependientes de calcio, dando lugar a alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular, pudiéndose producir daños a nivel del citoesqueleto y roturas de DNA y RNA (*Orrenius S et al., 1989*).

Numerosos estudios han mostrado el daño producido por sistemas generadores de radicales libres a gran variedad de proteínas celulares y plasmáticas, por ejemplo en procesos inflamatorios se ha observado el daño a la inmunoglobulina G (IgG), dando lugar a IgG alteradas (*Lunec J et al., 1986; Griffiths HR et al., 1989*) y a la antiproteasa alfa-1-antitripsina como consecuencia de la oxidación de residuos de metionina (*Carp H et al., 1982*).

## **2.6.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y DNA.**

Las alteraciones del DNA, como molécula portadora del material genético, merecen una atención muy especial, siendo importante conocer las consecuencias de la interacción del DNA con el estrés oxidativo. Así, en patologías en las que el estrés oxidativo es elevado, tales como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, esclerodermia, cancer, HTA, envejecimiento, etc., se observa un mayor nivel de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas, pérdida de fragmentos cromosómicos, llegando incluso a la pérdida total de determinados cromosomas, como es el caso del X en ciertos casos de envejecimiento en mujeres (*Roche E et al., 1996*).

Las alteraciones de DNA que más frecuentemente se observan en situaciones de estrés oxidativo son incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en las bases púricas y pirimidínicas.

El DNA está considerado como la principal diana del ataque por sustancias oxidantes in vivo. Los principales agentes involucrados en el daño directo son los radicales ión hidróxilo (OH<sup>·</sup>) y el peróxido de hidrógeno (*De Mello AC et al., 1985; Auroma OI et al., 1989*). Estos son capaces de provocar la escisión monocatenaria o bicatenaria de la molécula de DNA, en la mayoría de los casos, por roturas simples; además, son capaces de crear hidroxilación en las bases nitrogenadas tanto directamente, como por mediación de la peroxidación lipídica (*Casado JA et al., 1996*). Estos hechos generan mutaciones genéticas y posibilitan la transformación maligna celular.

Otro daño indirecto sobre el DNA por parte de los radicales libres, es el producido mediante endonucleasas calcio dependientes, cuya actividad se incrementa como consecuencia de un aumento de calcio intracelular (*Roche E et al., 1996*).

Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas, destaca la formación del 8-hidroxi guanina, con un alto efecto mutagénico y responsable de que durante la replicación se empareje con la adenina en vez de la citosina. Respecto a las bases pirimidínicas, se encuentran los glicoles de timina y citosina y los hidratos de pirimidina, los cuales dan lugar a fragmentación ya que las bases afectadas no pueden emparejarse correctamente (*Roche E et al., 1996*). Igualmente, pequeñas proporciones de  $\text{OH}^\cdot$  pueden interactuar con los azúcares componentes de DNA, dando lugar a la formación de radicales de azúcares (*Dizdaroglu M, 1993*).

El NO, también puede dar lugar a reacciones de desaminación y despurinización, mediante el  $\text{N}_2\text{O}_3$  formado en la interacción de NO, oxígeno y  $\text{O}_2^\cdot$ . También se ha observado entrecruzamientos producidos por la interacción del MDA con los grupos aminos del DNA (*Roche E et al., 1996*).

En los procesos de excitación fotoquímica, como sucede en la exposición a radiaciones UV, el oxígeno molecular da lugar a la formación de anión superóxido y conjuntamente a la formación de oxígeno singlete, interactuando este último directamente con el DNA, aumentando el daño directo que produce el radical hidroxilo.

El DNA mitocondrial, por su localización en el entorno de la cadena de transporte de electrones, principal fuente de ERO, presenta una mayor tasa de fragmentaciones y mutaciones por modificaciones oxidativas de sus bases, por ejemplo la presencia de 8-hidroxi-2desoxiguanosina es 16 veces superior a la encontrada para el DNA nuclear, siendo esta mayor tasa de mutación muy importante en los procesos de envejecimiento (*Ritcher C et al., 1988*).

## 2.7.- INTERACCIONES RADICALES LIBRES Y LÍPIDOS.

La peroxidación lipídica puede entenderse como una destrucción oxidativa de ácidos grasos en un autocatalítico e incontrolable proceso que da lugar a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos y una serie de productos secundarios, incluyendo un amplio rango de compuestos aldehidos. En su conjunto, todos estos procesos llegan a inactivar receptores y proteínas de membrana entre muchas otras acciones (*Dean RT et al., 1986; Esterbauer H et al., 1988*), en la tabla 3 se muestran algunos de estos productos finales.

n-Alcanales	2-Alquenes	4-Hidroxi-alquenes	Otros
Propanal	Acroleína	4-Hidroxi-nonenal	Malondialdehído
Butanal	Pentanal	4-Hidroxi-heptenal	2,4-Heptadienal
Pentanal	Hexenal	4-Hidroxi-2,5-nadlenal	2,4-Decadienal
Hexanal	Octenal	4,5-Dihidroxidecenal	5-Hidroxi-octenal
Nonanal	Nonenal		Butanona

Tabla 3.- Algunos de los productos secundarios de la peroxidación lipídica.

El término autooxidación es utilizado no con la intención de indicar la no intervención de agentes externos, sino para diferenciar este proceso de la oxidación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados llevada a cabo directamente por enzimas tales como ciclooxigenasa o lipooxigenasa. En

este término no aparece el colesterol, pero porque el substrato preferido son los ácidos grasos poliinsaturados (*Cheeseman KH, 1993*).

Los ácidos grasos más comúnmente encontrados en células animales, el linoleico (C18:2), araquidónico (C20:4) y docohexaenoico (C22:6), son potenciales dianas para sufrir el ataque de radicales, lo que indica una mayor susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces, por lo que ácidos grasos monoinsaturados, por ejemplo el ácido oleico (C18:1), son relativamente resistentes a este ataque y los saturados sólo son oxidables bajo condiciones extremas (*Cheeseman KH, 1993*).

Clásicamente se consideran tres fases en la peroxidación lipídica: iniciación, propagación y terminación (figura 4).

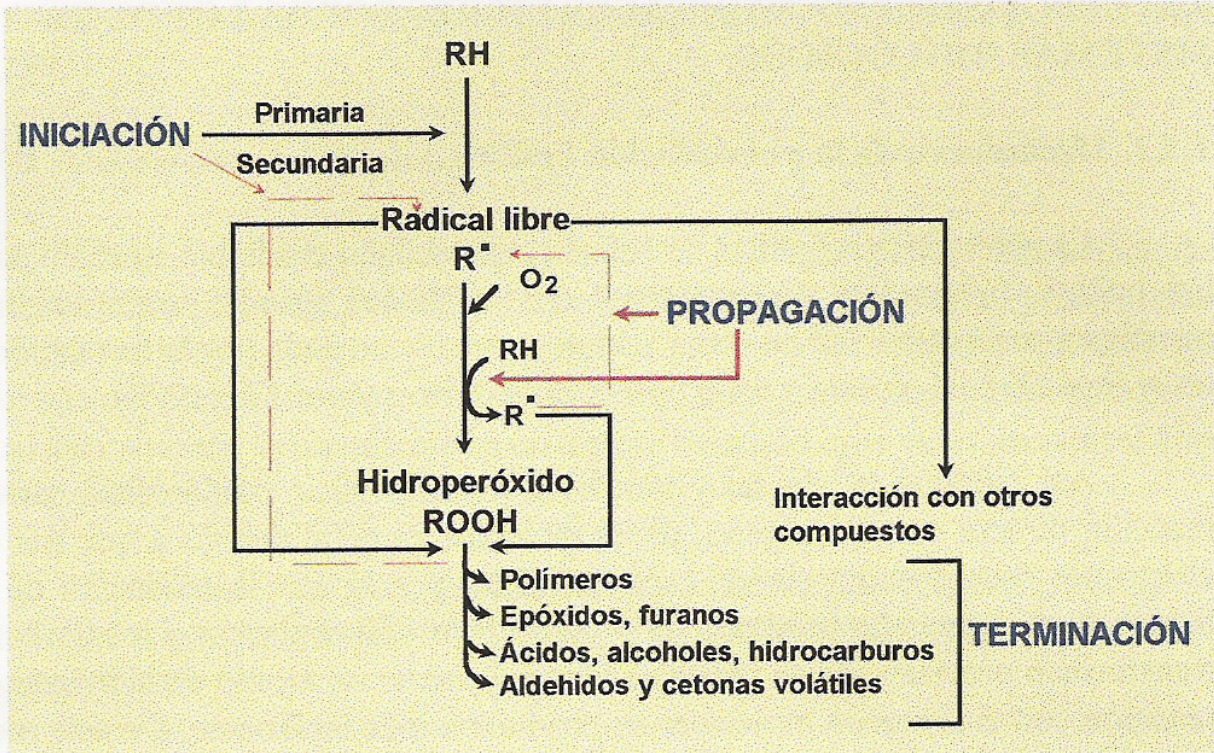


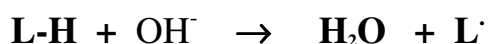
Figura 4.- Reacciones de oxidación de los lípidos.

### 2.7.1.- Iniciación.

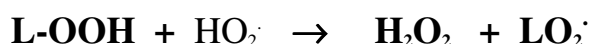
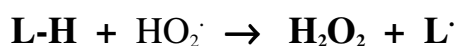
Las reacciones de iniciación dan lugar a formación de radicales libres a partir de ácidos grasos no saturados y/o de peróxidos lipídicos o hidroperóxidos.

La peroxidación lipídica comienza con el ataque de especies radicales con suficiente poder oxidativo como para abstraer un átomo de hidrógeno de un metilo de la cadena del ácido graso, dando lugar a un radical lipídico centrado en el carbono (*Cheeseman KH, 1993; Halliwell B et al., 1993*). La presencia de dobles enlaces cercanos en el ácido graso facilita la pérdida del hidrógeno, porque el radical formado se estabiliza deslocalizando el electrón desapareado en los dobles enlaces adyacentes (*Halliwell B et al., 1993*).

Dentro de las ERO que podrían iniciar la peroxidación lipídica se encuentra el radical hidroxilo, el cual puede atacar todas las moléculas biológicas incluyendo los lípidos de membrana.

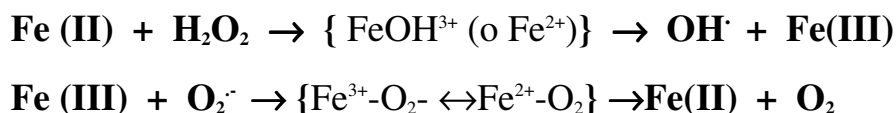


El anión superóxido no es capaz de iniciar por sí solo la peroxidación lipídica, pero su forma protonada ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) si lo es (*Bielski BHJ et al., 1983*).



Los complejos de hierro son considerados como verdaderos iniciadores de la peroxidación lipídica, ya que la mayoría de los estudios

involucran a metales iónicos de transición, observándose una tendencia a favor de las especies ferrilo y perferrilo aunque se piensa que es en definitiva un complejo  $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{3+} - \text{O}_2$  el iniciador de este proceso (*Schaich KM, 1992; Halliwell B et al., 1993*).



Para que tenga lugar esta iniciación es requerida la presencia de dobles enlaces, siendo el lugar donde se produce la abstracción del metilo que presenta un doble enlace en el carbono adyacente, por ejemplo el carbono en posición 11 del ácido linoleico.

El producto de esta abstracción es un radical lipídico centrado en el carbono (L), el cual inmediatamente se reagrupa en una estructura de dienos conjugados. Estos radicales centrados en el carbono rápidamente reaccionan con el oxígeno dando lugar a la formación del radical lipídico peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ). Son capaces de reaccionar con otros ácidos grasos y comenzar una nueva cadena de oxidación y la formación de hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOOH}$ ) (*Cheeseman KH, 1993*). Los hidroperóxidos lipídicos formados son múltiples por la gran variedad de formas isométricas que pueden formarse de un mismo ácido graso, así por ejemplo, para el ácido linoleico se pueden formar dos isómeros posicionales diferentes, para el ácido araquidónico seis isómeros diferentes, en definitiva, el número de isómeros va a depender del número de dobles enlaces (n), siendo iguales a  $2n-2$  (*Esterbauer H, 1993*).

Los hidroperóxidos lipídicos son generalmente considerados como productos primarios de la peroxidación lipídica (*Corongiu FP et al., 1986*).



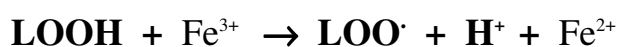
### **2.7.2.- Propagación.**

La iniciación de la peroxidación lipídica por un radical lipídico es conocida como propagación, aunque también se suele denominar iniciación secundaria. Esta etapa se caracteriza por un acúmulo de peróxidos lipídicos (*Cheeseman KH, 1993*).

La longitud de la cadena de propagación depende de múltiples factores, entre los que se encuentran, la proporción lípido/proteína existente en la membrana (a mayor cantidad de proteínas, mayor probabilidad de reacción de un radical con ellas), la composición en ácidos grasos, la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidantes entre otros (*Halliwell B et al., 1993*). Siendo muy variados los productos que se pueden formar en esta etapa como consecuencia de los diferentes isómeros que pueden formarse (*Porter NA, 1990*).

La peroxidación lipídica se puede ver como una cadena de reacciones autocatalíticas con el suficiente potencial como para consumir todos los pufas existentes en el sistema donde se ha iniciado.

Los peróxidos lipídicos son muy inestables en presencia de metales de transición como hierro o cobre, así sales ferrosas reaccionan rápidamente con hidroperóxidos lipídicos, generando radicales alcóxilo lipídicos y sales férricas las cuales pueden generar radicales peróxilo.



La presencia de iones metálicos es casi imprescindible para romper los hidroperóxidos lipídicos, con generación de radicales libres que inicien nuevas cadenas de lipoperoxidación, de hecho, existen estudios que pretenden determinar la certeza de la peroxidación lipídica iniciada por complejos de hierro y las reacciones de propagación dependientes de la presencia de hidroperóxidos lipídicos preformados (*Cheeseman KH, 1993*).

Las sales ferrosas son más activas en estimular la lipoperoxidación que las férricas, son más solubles y reaccionan rápidamente con peróxidos generando gran cantidad de radicales alcoxilo reactivos, mientras que las sales férricas generan menos radicales peroxilo. Por esta razón en presencia de agentes reductores, por ejemplo el ascorbato, se estimula la peroxidación lipídica al mantener el hierro en su forma ferrosa (*Slater TF y Cheeseman KH, 1987*).

La protección con agentes queladores de metales libres, no es tampoco eficaz en todos los casos, siendo importante la reacción o proporción de queladores/metales, por ejemplo la clásica quelación con EDTA, la cual durante algún tiempo se consideraba como inhibidora de las reacciones dependientes de hierro, puede dar lugar a la formación de un complejo de hierro que promueve la peroxidación lipídica si se usa una apropiada proporción metal/quelador (*Minotti G et al., 1992*). Las hemoproteínas también son capaces de iniciar la descomposición de hidroperóxidos lipídicos hacia radicales libres, así la hemoglobina, citocromo P450 y otros citocromos son capaces de iniciarla mientras que la transferrina y la lactoferrina no lo son y la ferritina sólo cuando está saturada con hierro (*Gutteridge JMC et al., 1981*).

La ruptura de los hidroperóxidos lipídicos es importante por dos razones:

1) Por la generación de radicales que propagan la peroxidación lipídica.

2) Por generar fragmentos o productos no radicales como son aldehídos, muchos de los cuales presentan actividad biológica.

La identidad del producto depende de varios factores, entre los que se encuentran el propio ácido graso del cual parte, de la composición del grupo hidroperóxido dentro del ácido graso poliinsaturado y en que lado del grupo hidroperóxido se produce la escisión o rotura (*Cheeseman KH, 1993*).

### **2.7.3.- Reacciones de terminación.**

Las reacciones de terminación se dan mediante interacciones radical-radical, las cuales ocurren si las condiciones son favorables. Estas interacciones tienen el efecto de terminar las cadenas de peroxidación gracias a la formación de productos no radicales.



Obviamente las reacciones radical-radical requieren la presencia, en relativamente alta concentración, de los reactantes.

También la interacción de dos radicales peroxilo podría producir oxígeno singlete la cual es una especie reactiva (*Cheeseman KH, 1993*).

#### **2.7.4.- Daño consecuente de la lipoperoxidación.**

La lipoperoxidación es un fuerte proceso destructivo en seres vivos. Puede atacar directamente a las células, por ataque a estructuras de la membrana, o indirectamente por liberación de productos reactivos (*Cheeseman KH, 1993*).

##### **2.7.4.1.- Daño directo a membranas.**

Un factor crítico en las membranas biológicas es su fluidez, la cual está determinada en gran parte por la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados a los fosfolípidos de la bicapa. No es de sorprender que la lipoperoxidación afecte a las propiedades biofísicas de la membrana, ya que la diana preferente son las moléculas que las determinan.

La lipoperoxidación produce descenso de fluidez de membrana, cambios en las propiedades de las fases de la membrana y disminución de su resistencia eléctrica. Por otra parte, el entrecruzamiento catalítico causa restricción de la movilidad de las proteínas de membrana (*Richter C, 1987*).

Todos estos ataques pueden dar lugar a que la membrana altere su función principal, es decir, actuar como barrera. La peroxidación lipídica es en sí algo más que la simple producción de puntuales poros en la membrana, dando lugar a una pérdida de la homeostasis iónica, lo cual es un importante tipo de descompartimentación y destruyendo el orden que imparte la membrana al metabolismo celular. Por ejemplo, el calcio se

encuentra en concentración submicromolar en el citosol y milimolar fuera, alteraciones en la homeostasis de este metal, llevada a cabo por la membrana, incrementan el calcio citosólico, lo cual conlleva activación de un gran número de enzimas y el calcio pasa de ser un poderoso controlador metabólico, bajo condiciones normales, a un inductor de letales procesos, entre ellos la activación de diversas fosfolipasas y proteasas (*Jones DP et al., 1983; Bellomo G et al., 1985; Orrenius S et al., 1989; Liao D et al., 1993*).

Puede resultar en la inactivación de bombas responsables del mantenimiento homeostático iónico, disminución de la actividad de enzimas asociadas con membranas, incluidas mitocondrias y aparato de Golgi, por ejemplo, glucosa-6-fosfato y citocromo P-450 (*Poli G et al., 1981; Herman B et al., 1990*).

Hay enzimas más resistentes como es el caso de la NADPH: citocromo P450 reductasa quizás por ser periférica. Otras veces hay una estimulación de enzimas como puede ser el caso de la fosfolipasa A2, convirtiéndose en un mecanismo de defensa ya que esta enzima tiene preferencia por los fosfolípidos de membrana oxidados como sustratos y los ácidos grasos peroxidados son rápidamente liberados de los fosfolípidos con la consecuente formación de lisofosfolípidos que son rápidamente reciclados. Un incremento en la actividad de la fosfolipasa A2 implica una acumulación de estos lisofosfolípidos y si su reciclado no tiene lugar rápidamente, se puede alterar la estructura de la membrana y dar como resultado la lisis celular (*Ursini F et al., 1991*).

#### **2.7.4.2.- Efectos indirectos de la peroxidación lipídica.**

Estos efectos se deben principalmente a los productos carbonilos de la lipoperoxidación, debido a que son biológicamente activos y pueden difundir fuera del sitio de producción. Algunos de estos aldehidos pueden quedar unidos al fosfolípido y volver a atacar (*Cheeseman KH, 1993*).

El número de productos es muy variado por la gran variedad de fosfolípidos, formas isoméricas y productos que se pueden obtener. Los productos típicos encontrados en extractos de muestras biológicas oxidadas, incluyen n-alcanales de 3 a 12 átomos de carbono, 2-alquenaes de 4 a 9 átomos de carbono de longitud, 2,4-alcadienales, 4-hidroxi-alquenaes y otros compuestos carbonilo de varios tipos incluido MDA. Otros se deben a reacciones secundarias, lo cual complica aún más su estudio (*Cheeseman KH, 1993*).

Los 4-hidroxi-alquenaes, son los más interesantes desde un punto de vista bioquímico y en particular el HNE (4-hidroxi-nonenal) porque se produce en relativa gran cantidad y es muy reactivo, los insaturados 2-alquenaes son más reactivos que los n-alcanales pero menos representativos.

El HNE es producto de la oxidación del ácido araquidónico (*Esterbauer H et al., 1990*). Los hidroxi-alquenaes son altamente electrofílicos y pueden reaccionar con biomoléculas electrófilas, así el HNE puede reaccionar con proteínas que presenten grupos tiol a pH fisiológico relativamente rápido, la interacción HNE-GSH tiene un doble significado:

- 1) Vía de desintoxicación de HNE.
- 2) Vía de deplección de GSH, lo que podría incrementar el estrés en la célula, al disminuir el sustrato de la GPX.

A menor proporción el HNE puede reaccionar con grupos aminos, por lo que un amplio rango de enzimas han mostrado ser inhibidas por HNE, la mayoría con grupos tioles necesarios para su actividad (*Rossi MA et al., 1990*).

Los hidroalquenes pueden inhibir las enzimas reparadoras de DNA. Se le ha observado una actividad quimiotáctica, pudiendo amplificar la reacción inflamatoria (*Cheeseman KH, 1993*).

Otro producto secundario es el malondialdehído (MDA), formado durante las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos, durante la reestructuración intramolecular de la estructura de ácidos grasos, reagrupación necesaria para la estabilización de los radicales libres formados en la cadena alifática del ácido graso (*Valenzuela A, 1991*).

Este producto puede ser metabolizado a nivel celular, por ejemplo por la aldehído deshidrogenasa hepática, y/o excretado. Está involucrado en el daño a la célula y en la formación de pigmentos de lipofucsina durante el envejecimiento, donde se encuentra condensado con los grupos amino libres de proteínas formando derivados fluorescentes debido a estructuras tipo base de Schiff (*Valenzuela A, 1991*).

Hay evidencias de la reacción de MDA con algunos aminoácidos y con el DNA y el RNA, presentando propiedades mutagénicas y actuando como carcinógeno químico.

## 2.8.- MECANISMOS ANTIOXIDANTES.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el organismo posee un sofisticado y complejo sistema de mecanismos antioxidantes que le permiten defenderse de los ataques provocados por el estrés oxidativo.

Este sistema está compuesto por múltiples antioxidantes con diferentes funciones, algunos de ellos son enzimas, otros son compuestos pequeños, pudiendo ser hidrofílicos o lipofílicos (Romero D et al., 1989; Peña de la A et al., 1997). Entre sus funciones se encuentran la supresión de generación de radicales libres, atrapamientos de estos y reparación del daño producido.

Desde el punto de vista terapéutico, existen sustancias exógenas que pueden prevenir el daño oxidativo utilizando mecanismos análogos a estos sistemas antioxidantes endógenos, inhibiendo o previniendo la generación de radicales libres, potenciando la actividad enzimática antioxidante o bloqueando la amplificación del daño oxidativo (Lindhal T et al., 1995).

En la figura 5 se esquematiza este sistema de defensa, siendo tan importante conocer el sistema de defensa del organismo frente al daño oxidativo, como los mecanismos de actuación de los radicales libres.

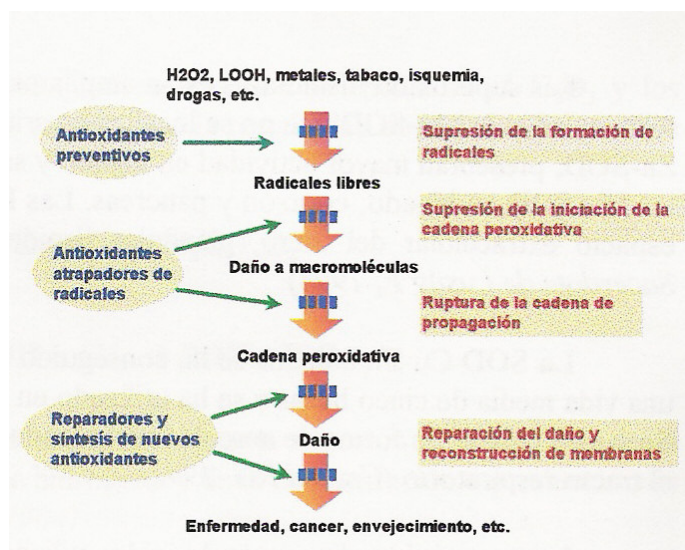


Figura 5.- Esquema representativo de las líneas de defensa.



A continuación veremos algunos de estos antioxidantes.

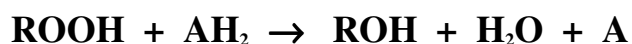
### **2.8.1.- Mecanismos enzimáticos.**

#### **2.8.1.1.- Catalasa.**

Fue una de las enzimas antioxidantes descritas, hallándose en prácticamente todas las células de animales y plantas (*Deisseroth A et al., 1970*). Se trata de una enzima intracelular ferriporfirínica, localizada principalmente en peroxisomas (80%) y citosol (20%) (*Nieto N, 1993*).

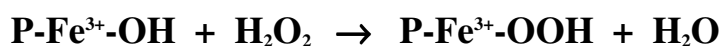
Se halla constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo.

La función de la catalasa es doble, ya que tanto cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (actividad catalítica), como la oxidación de donadores de hidrógeno, como pueden ser metanol, etanol, fenoles, etc., con la consumición de un mol de peróxidos (actividad peroxídica) (*Aebi H, 1984*). Dentro de los peróxidos consumidos se encuentra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los hidroperóxidos alquilo, siendo en este caso la reactividad de la catalasa inversa a la longitud de la cadena.



El que predomine la primera reacción o la segunda, va a depender de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el sistema (*Aebi H, 1984*). Se ha observado que la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es muy rápida, mientras que las reacciones

peroxidativas son realmente lentas (*Aebi H, 1984*). En ambas reacciones, lo primero en formarse es un complejo primario entre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el hidroperóxido y el hierro del grupo prostético, dando lugar a la formación del complejo activo I, complejo que reacciona con otra molécula de hidroperóxido para dar finalmente agua y oxígeno (*Deisseroth A et al., 1970*).



La catalasa presenta una afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> baja, es decir necesita altas concentraciones del mismo para poder trabajar rápido (*Roberfroid M et al., 1995*), aunque se ha observado un rápida inactivación de la actividad de la catalasa a concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> superiores a 0.1M, por la formación de los complejos inactivos II y III (*Aebi H, 1984*), igualmente se ha observado inactivación de la catalasa por anión superóxido (*McCord J, 1989*).

La concentración de este enzima es distinta en los diferentes órganos o compartimentos, así, en plasma su concentración es bastante baja (*Ramón JR, 1993*), encontrándose prácticamente ausente en cerebro, aunque su actividad puede ser inducida por el factor de crecimiento nervioso (*Evans PH, 1993*), siendo muy activa en hígado y eritrocitos (*Nieto N, 1993*).

Se ha observado que puede ser el antioxidante más importante cuando se escapa de las células necrosadas, autolimitando la extensión del daño por radicales libres. Experimentalmente se ha utilizado con éxito en la isquemia-reperfusión del corazón aislado de rata, para minimizar las

arritmias severas y la destrucción miocárdica producida por ERO (*Ramón JR, 1993*).

### **2.8.1.2.- Superóxido dismutasa.**

Familia de metaloenzimas, conocida por acelerar la dismutación espontánea de  $O_2^-$  hacia  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Esta reacción se puede realizar de forma espontánea, aunque ocurre de manera muy lenta. Si la SOD cataliza dicha reacción, la velocidad se aumenta  $10^9$  veces (*Casado JA et al., 1996*).



Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos aeróbicos, jugando un importante papel en el control de los niveles de  $O_2^-$  en los compartimentos celulares (*Monte M et al., 1994*).

Se aislaron por primera vez en 1939, por Man y Keilin a partir de eritrocitos bovinos, aunque en este primer aislamiento no se le asoció ninguna actividad enzimática, siendo denominada hemocupremia por su contenido en cobre. Posteriormente McCord J et al. (1969), mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por eliminación de  $O_2^-$ , siendo renombrada a la hemocupremia como superóxido dismutasa (SOD).

Hoy en día, se pueden localizar en mamíferos tres grandes familias separadas en base a los metales que contienen y/o su localización en la célula. Dos familias son intracelulares, las superóxido dismutasas cobre, cinc dependientes (Cu, Zn-SOD) y las manganeso dependientes (Mn-SOD)

y una extracelular, las superóxido dismutasas extracelulares (Ec-SOD) (*Monte M et al., 1994*).

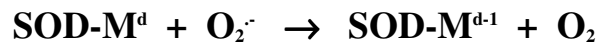
Las Cu, Zn-SOD, presentan un peso molecular de 32000 daltons, estando constituidas por dos subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de cinc cada una (*Fridovich I, 1975*). De estos dos metales, el Cu es el que presenta una actividad catalítica, localizándose en el sitio activo de la enzima, mientras que el Zn desempeña una función básicamente estructural (*Dreosti IE et al., 1979*). Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula. Su gen se localiza principalmente en el cromosoma 21 humano (*Monte M et al., 1994*).

Las Mn-SOD, están constituídas por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de Mn por unidad. Su peso molecular es de 80000 daltons y su localización primordialmente mitocondrial (*Fridovich I, 1975*). Su gen se localiza en el cromosoma 6 humano (*Monte M et al., 1994*).

La última familia, las Ec-SOD, fue descubierta en 1982 por Stefan Marklund en tejido pulmonar, tratándose de un tetrámero de 135000 daltons y con un átomo de cobre por subunidad. Su gen se localiza en el cromosoma 4 humano. Esta SOD presenta menos actividad que las intracelulares (*Monte M et al., 1994*).

Las superóxido dismutasas están ampliamente distribuidas por todos los tejidos, salvo la Mn-SOD que no se localiza en eritrocitos. En humanos, las Cu, Zn-SOD, presentan mayor actividad en hígado y sustancia blanca de cerebro, y las Mn-SOD en hígado, corazón y páncreas. Las Ec-SOD son más activas en el espacio extracelular del útero, glándula tiroidea y páncreas (*Monte M et al., 1994*).

El mecanismo general de actuación de las SOD es el mostrado a continuación.



La SOD ha sido utilizada en la limitación del daño oxidativo, mediante inyección directa en sitios de inflamación, demostrando un efecto antiinflamatorio (*Winrow VR et al., 1993*). También se ha observado su papel protector de la mucosa intestinal en procesos de isquemia reperusión, en radioterapia (*Monte M et al., 1994*), así como en otras patologías y órganos.

No se ha descrito hasta la fecha en seres humanos, ninguna deficiencia congénita completa de SOD y catalasa, debido, tal vez a que las mutaciones de sus genes son incompatibles con la vida (*Halliwell B, 1991*).

### **2.8.1.3.- Glutación peroxidasa.**

Este término engloba a un conjunto de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con glutación (GSH), dando lugar a la formación de glutación disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción de hidroperóxidos.



El radical (R) puede ser cualquier grupo orgánico, alifático o aromático, o simplemente hidrógeno, siendo en este caso el sustrato el  $H_2O_2$  (*Mannervik B, 1985*).

En organismos vivos se encuentran dos grandes grupos, las glutatión peroxidasa-selenio dependientes y las selenio independientes (*Mannervik B, 1985; Nieto N 1993*).

Las selenio dependientes son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes selenio-cisteína en su centro activo (*Mannervik B, 1985*). Son activas frente a hidroperóxidos orgánicos y  $H_2O_2$ , localizándose primordialmente en citosol (70%), y en menor cantidad en mitocondrias (30%), en la matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial (*Nieto N, 1993; Benzi G et al., 1995*).

El segundo grupo no requiere selenio para su actividad catalítica, presentando en general una menor afinidad por el  $H_2O_2$ . Realmente esta actividad peroxidasa es llevada a cabo por las glutatión transferasas, las cuales se ha observado que aumentan su actividad de peroxidasa, disminuyendo su actividad transferasa, en situaciones de estrés oxidativo; este aumento y cambio de actividad ha sido observado en mitocondrias de hígado de rata entre otros órganos y especies (*Warholm M et al., 1985; Aniya Y et al., 1993; Mosialou E et al., 1993*).

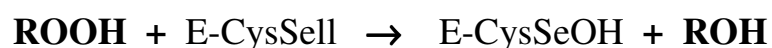
Las selenio independientes se localizan en citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas. Son varias isoenzimas, al menos 8 distintas, formadas por dos subunidades, presentando distinta reactividad y/o afinidad por uno u otro sustrato según su localización, así

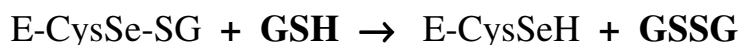
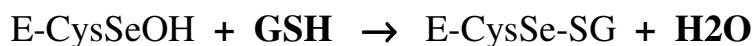
por ejemplo la transferasa microsomal presenta actividad peroxidasa frente al hidroperóxido, mientras que la citosólica no (*Mannervik B, 1985; Aniya Y et al., 1993*).

En la mayoría de los animales las selenio dependientes son las responsables de la mayor fracción de actividad peroxidasa, aunque se ha observado que la importancia relativa de las selenio dependientes y selenio independientes, en lo que respecta a actividad peroxidasa, varía no solo entre especies, sino también entre tejidos de una misma especie, así, por ejemplo, se observa una amplia contribución de la actividad peroxidasa de las selenio independientes en testículos de rata, en comparación con otros órganos, así como una casi ausencia de selenio en cobayas (*Guthenberg C, 1985*).

En mamíferos se ha descubierto un segundo tipo de glutatión peroxidasa selenio dependientes que, a diferencia de las anteriores está constituida por una sola unidad, son las formas isoenzimáticas de las glutatión peroxidasas selenio dependientes, que actúan sobre hidroperóxidos de fosfolípidos sin necesidad de la actuación de la fosfolipasa A2. Son enzimas solubles, localizados en citosol pero activos sobre membranas (*Maiorinio M et al., 1990*). Son menos activas sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las glutatión selenio dependientes, presentando igual reactividad frente a hidroperóxidos de ácido linoleico y siendo las únicas activas sobre hidroperóxidos de fosfolípidos (*Maiorinio M et al., 1990*).

El mecanismo de acción de las selenio dependientes sigue el esquema de la reacción.





#### **2.8.1.4.- Glutación reductasa.**

Se trata de una flavoproteína encargada de catalizar la reducción NADPH dependiente del glutatión disulfuro oxidado, hacia glutatión reducido (GSH).



Su importancia radica en la capacidad para mantener los niveles de glutatión reducido, el cual juega un importante papel en varios procesos de óxido-reducción, entre los cuales se encuentra el servir de substrato donador de hidrógenos en la actividad de la glutatión peroxidasa.

#### **2.8.2.- Mecanismos no enzimáticos.**

##### **2.8.2.1.- Vitamina E.**

Su estructura química es la de una molécula de tocol, constituida por un núcleo hidroxicromona al que se le une una cadena de fitilo. Existen al menos ocho formas isoméricas, las cuales se dividen en dos grupos, cuatro con una cadena saturada de fitilo ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol) y cuatro con una cadena de fitilo de dobles enlaces en la posición 3', 7' y 11' ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocotrienol). Las diferencias entre las formas isoméricas de cada grupo se encuentran en la posición de los grupos metilo en el anillo.



De estas formas isoméricas el  $\alpha$ -tocoferol predomina en muchas especies, siendo la forma más activa biológicamente y el mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y sangre (*Burton GW et al., 1982*).

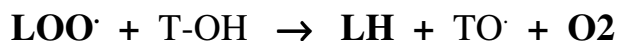
La dosis diaria recomendada oscila entre 800-1000 mg/día siendo necesario aumentar sus requerimientos cuando se produce una ingesta elevada de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Su toxicidad es escasa, no observándose efectos secundarios con dosis de hasta 3200 mg/día (*Vademécum internacional, 2005*).

Se ha demostrado experimental y clínicamente, la función de la vitamina E como antioxidante lipofílico, mediante la eliminación de radicales libres (*Tapel A, 1968; Chow CK, 1991; Liebler DC, 1993*), siendo conocida su actividad para eliminar oxígeno singlete, así como otros radicales del oxígeno (*Sies H et al., 1993*).

El sitio activo se encuentra en el grupo 6-hidroxilo del anillo cromanol, el cual se sitúa, a nivel de la membrana, cerca de la superficie polar, mientras que la cadena fitilo, se encuentra interaccionando con los ácidos grasos de los fosfolípidos en la región no polar, siendo esta la responsable de la cinética de transporte y retención de membranas, no estando completamente fijo en estas (*Graham WB et al., 1990*).

El mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos, por  $\alpha$ -tocoferol, está ampliamente estudiado “in vitro” (*Liebler DC, 1993*). Al parecer es a nivel del radical lipídico peroxilo (LOO $\cdot$ ), en lo que respecta a la cadena de propagación de la peroxidación lipídica, donde se

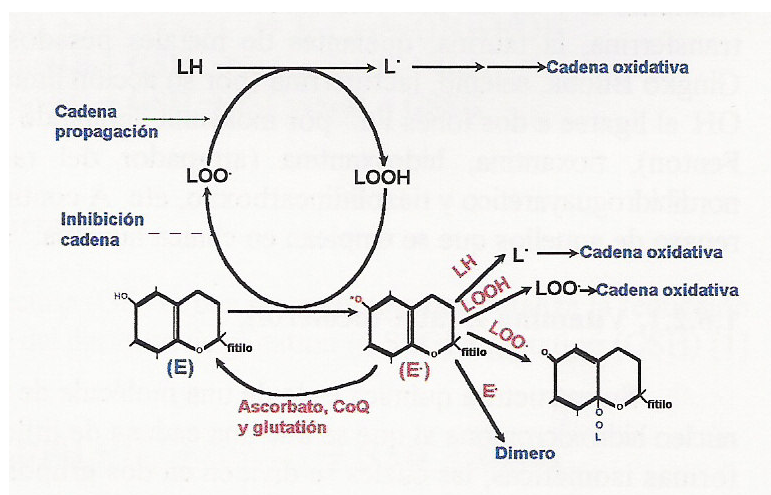
observa su actuación, eliminándolo e impidiendo que continúe la cadena y por lo tanto la formación de nuevos radicales (*Witing LA, 1980*).



Se conoce que el  $\alpha$ -tocoferol, atrapa al radical peroxilo 10 veces más rápido de lo que este reacciona con otro lípido, es decir, sobre el 90% de los radicales peroxilo son atrapados por  $\alpha$ -tocoferol antes de que ataquen a otros lípidos, igual eficacia se ha observado “in vivo” para atrapar radicales alcoxilos e hidroxilos (*Machlin LJ, 1991*).

El radical  $\alpha$ -tocoferoxilo formado en la reacción, puede seguir varias direcciones: reaccionar con otro radical peroxilo y dar un aducto, reaccionar con otro radical de vitamina E y dar un dímero, ser reducido por un reductor como la vitamina C, ubiquinol o glutatión; otra vía es la sustracción de un átomo de hidrógeno de lípidos o hidroperóxidos, dando un radical lipídico o radical peroxilo respectivamente, pudiéndose volver a poner en funcionamiento la cadena de propagación. En la figura 6 se representan estas

vías. La potencia de la vitamina E como antioxidante va a depender de estas reacciones competitivas (*Packer L, 1991*).



*Figura 6.- Posibles vías de destrucción del radical tocoferoxilo.*

Como ya se ha mencionado, son numerosos los estudios que demuestran que el  $\alpha$ -tocoferol actúa como un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos. Entre estos se encuentran los realizados en células rojas sanguíneas, las cuales son excelentes modelos de estudio del daño oxidativo, por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y su continua exposición a altas concentraciones de oxígeno. En estas células la adición o incremento en la producción de radicales libres causa hemólisis, observándose la supresión de dicha hemólisis por supresión de la oxidación mediante la adición de vitamina E, mostrándose que juega un papel importante en la ruptura de la cadena de las membranas gracias a su condición lipofílica (*Niki E, 1995*).

Otros estudios, utilizando LDL, han demostrado que la vitamina E es el más abundante y más activo antioxidante en LDL (*Jessup W et al., 1990*), mostrándose igualmente que una suplementación oral con  $\alpha$ -tocoferol incrementa el contenido en vitamina E en LDL y su resistencia a la oxidación, evitando de este modo el desarrollo de arterioesclerosis (*Gey KF et al., 1987; Dieber-Rotheneder M et al., 1991; Álvarez-Sala L et al., 1996*).

También existen estudios que muestran una cierta capacidad prooxidante de la vitamina , actuando como un componente en la cadena de propagación, ya que su incorporación en membrana cerca de la superficie facilitaría la captura de radicales de la fase acuosa, pudiendo seguir, el radical tocoferoxilo resultante, la vía de ataque a otros lípidos e iniciando la cadena de oxidación. Parece ser que esta actividad prooxidante “in vivo” no es tan importante, debido a los agentes reductores como ascorbato, ubiquinol y glutatión, que regeneran el  $\alpha$ -tocoferol (*Nagaoka S et al., 1990*;

*Bowry VW et al., 1995*). El ascorbato es consumido primero cuando el radical tocoferilo se encuentra en la fase acuosa, mientras que el ubiquinol es consumido primero cuando los radicales son formados en la membrana.

Son muy numerosos los estudios que muestran su relación y actuación en el tratamiento de patologías diversas, así, se ha observado que deficiencias severas o crónicas pueden dar lugar a un progresivo síndrome neurológico, involucrando a la vitamina E en un óptimo desarrollo y mantenimiento de la función e integración del sistema nervioso y músculo esquelético. Otros estudios evidencian que suplementando la dieta con vitamina E se reduce el riesgo de enfermedades del corazón, igualmente, se ha observado su acción en cáncer, envejecimiento...etc. (*Landvik SV et al., 1995*).

#### **2.8.2.2.- Coenzima Q.**

Se trata de una benzoquinona que presenta en la posición 6 una cadena lateral constituida por un número variable de unidades isoprenoides. Su función principal es de actuar como transportador móvil en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, transfiriendo electrones desde los complejos tipo DH al complejo III.

Su actividad antioxidante fue observada, en estudios pioneros, por Mellors y Tappel, los cuales mostraron una eficiente inhibición de la lipoperoxidación por ubiquinol-6 (*Mellors A et al., 1966*).

A partir de este estudio, se realizaron muchos otros en los que se demostró la interacción directa del coenzima Q con radicales libres, disminuyendo así la oxidación de lípidos en liposomas, membranas

(mitocondrias, microsomas, etc.), células y lipoproteínas (*Ernster L et al., 1992*).

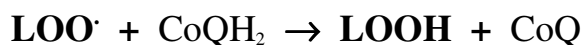
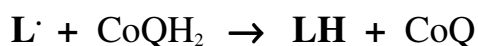
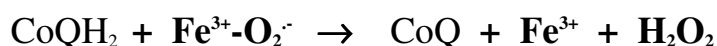
En estudios iniciales se sugería que tanto la forma oxidada del coenzima Q (ubiquinona) como la reducida (ubiquinol, CoQH<sub>2</sub>), ejercían los mismos efectos antioxidantes, aunque en experimentos posteriores se mostró que era requerida una muy alta concentración de ubiquinonas para observar una actividad antioxidante significativa (*Landi L et al., 1990*), encontrándose que en diferentes fracciones membranosas la forma reducida o ubiquinol, demostraba una mayor habilidad que la forma oxidada para inhibir la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>2+</sup>-ascorbato (*Kagan VE et al., 1990*).

Igualmente se ha demostrado “in vitro”, que ubiquinoles con cadenas laterales isoprenoides cortas (Q<sub>1</sub>-Q<sub>4</sub>) ejercen un efecto inhibitor de la lipoperoxidación más potente que sus homólogos de cadena larga (Q<sub>5</sub>-Q<sub>10</sub>) (*Kagan VE et al., 1990*).

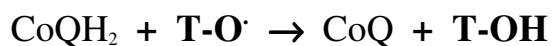
Se cree que el mecanismo antioxidativo más utilizado o significativo es el del mantenimiento del pool de vitamina E a través de la reducción del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo. Este dato está reforzado por el hecho de que la constante de interacción ubiquinol-radical tocoferoxilo, es mucho más alta que la constante de reacción con radical peroxilo, por lo que se observa una preferencia por reducir  $\alpha$ -tocoferoxilo más que por interaccionar con radicales peroxilo (*Mukai K et al., 1993*).

De los estudios realizados por numerosos grupos de investigación, se extraen varios mecanismos de actuación antioxidativa. Así uno de los mecanismos es la reducción directa de especies perferrilo (Fe<sup>3+</sup>-O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) por

CoQH<sub>2</sub>, con la consecuente prevención del ataque de estas especies, considerándose este mecanismo como inhibidor de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo. Otro mecanismo es la interacción directa con anión superóxido y con radicales alquilo y peroxilo, mediante donación de átomos de hidrógeno a estos radicales (*Litarru GP, 1994; Kagan VE et al., 1990*).



Uno de los mecanismos más significativos, como se ha comentado anteriormente, es la regeneración de  $\alpha$ -tocoferol.



Estudios recientes, involucran al CoQ en la modificación de la extensión de la peroxidación lipídica inducida por estrés endógeno o exógeno y/o inducida por manipulación de la grasa dietaria, demostrando que la inducción de oxidación por un estrés, ya sea exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio físico) aumenta el contenido de CoQ en membrana, siendo además mayor el efecto cuanto más insaturada es la grasa de la dieta (*Mataix J et al., 1997*).

En la figura 7, se muestran algunas de estas vías antioxidantes.

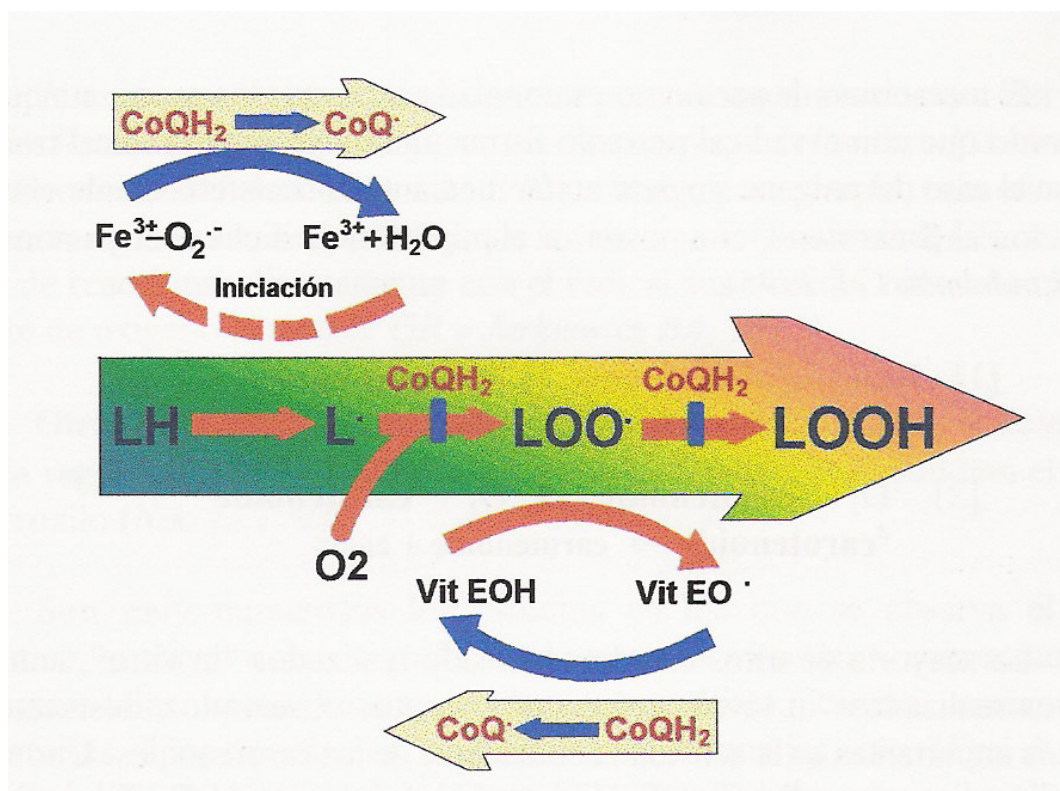


Figura 7.- Esquema de los distintos mecanismos antioxidantes llevados a cabo por el coenzima Q.

### 2.8.2.3.- Carotenoides.

El término carotenoide se utiliza generalmente para designar a moléculas de 40 átomos de carbono y un extenso sistema de dobles enlaces conjugados (Handelman GJ, 1995). Son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el carotenoide prototipo el  $\beta$ -caroteno, sobre todo por ser el que mayor actividad vitamina A posee (Simpson KL et al., 1981). Los animales, incluyendo los humanos, no son capaces de sintetizar “de novo”  $\beta$ -carotenos, siendo su fuente principal de ingreso los vegetales, frutas, leche y derivados, pescados y crustáceos (Álvarez-Sala L et al., 1996).

Se ha observado en numerosos estudios su actividad antioxidante, mostrándose su capacidad para reaccionar con oxígeno singlete, radical

peroxilo, radical hidroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas (*Handelman GJ, 1995*).

De estos estudios se extrae que la capacidad antioxidante de los carotenoides, depende fundamentalmente de la concentración de O<sub>2</sub> existente, la estructura química de los mismos y el efecto acompañante de otros antioxidantes (*Krinsky NI, 1993*).

Los carotenos presentan una mayor actividad a bajas presiones de oxígeno, perdiendo dicha actividad conforme aumenta dicha presión (*Krinsky NI, 1993; Handelman GJ, 1995*).

En lo referente a la relación estructura-actividad antioxidante, se ha observado que no todos los carotenoides muestran la misma capacidad antioxidativa. Así, en estudios “in vitro” se observa que los carotenoides con 8 ó más dobles enlaces son 1000 veces más efectivos, a la hora de reaccionar con oxígeno singlete, que los que presentan 5 ó menos (*Handelman GJ, 1995*).

Con respecto al oxígeno singlete, se ha mostrado “in vitro” que una molécula de β-caroteno es capaz de interaccionar con al menos 100000 moléculas de oxígeno singlete, antes de su total destrucción (*Handelman GJ, 1995*).

Otros estudios han demostrado “in vitro” una posible relación de los β-carotenos en la inhibición de la peroxidación lipídica. Es posible que esta acción consista esencialmente en transformar el radical α-tocoferóxilo en α-tocoferol, regenerando de este modo el potencial antioxidante de la vitamina E (*Palozza P et al., 1992*).



La mayoría de los estudios han sido realizados “in vitro”, aunque los estudios realizados “in vivo” refuerzan los datos observados, destacando dos aspectos importantes en la actividad antioxidante de los carotenoides, uno de ellos es la eficiencia en una disminución directa de la peroxidación lipídica y el otro es la habilidad de esta molécula para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes (*Krinsky NI, 1993*).

#### **2.8.2.4.- Vitamina C (ácido ascórbico).**

El ácido ascórbico (C<sub>6</sub>-H<sub>8</sub>-O<sub>8</sub>) es una querolactona, hidrosoluble, estructuralmente similar a la glucosa. Está presente fundamentalmente en frutas frescas (cítricos), tomates, pimientos verdes...; aunque también se encuentra en algunos derivados animales como la leche (*Álvarez-Sala L, 1996*).

Los requerimientos diarios oscilan entre 60-100 mg.

El ácido ascórbico presenta la capacidad de poder sufrir rápidamente dos procesos oxidativos monovalentes consecutivamente con la formación del radical semidihidroascorbato (Asc.-) como intermediario, radical relativamente no reactivo. Estas características hacen de este compuesto un excelente antioxidante hidrosoluble donador (*Buettner GR et al., 1995*) (*figura 8*).

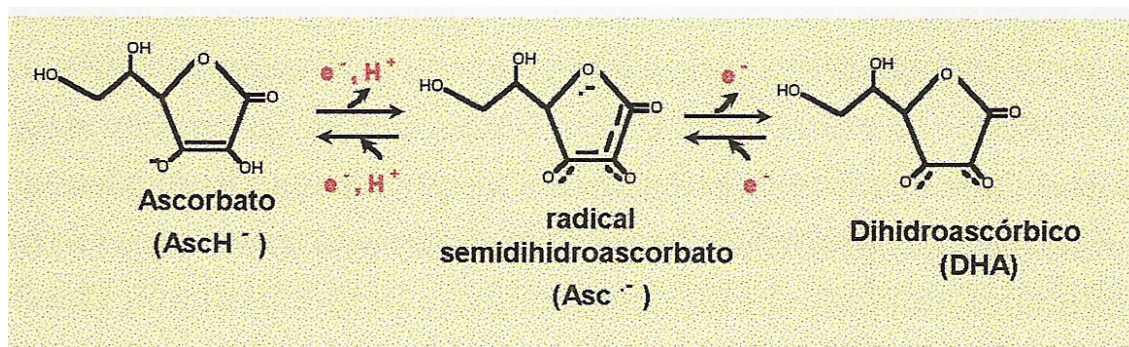
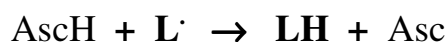
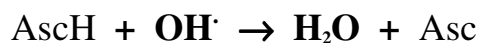


Figura 8.- Procesos oxidativos monovalentes sufridos por el ácido ascórbico.

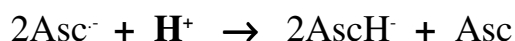
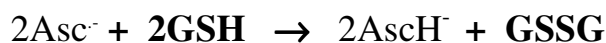
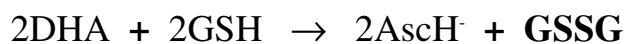
El ascorbato, es capaz de interactuar directamente con O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos (Stadman RE, 1991; Buettner GR et al., 1995).



Otro de los efectos de la vitamina C, es la de intervenir en el reciclaje de la vitamina E, reduciendo el radical  $\alpha$ -tocoperóxido y transformándolo de nuevo en  $\alpha$ -tocoferol, obteniendo por contrapartida un radical de vitamina C (Weffers H et al., 1988; Niki E, 1991; Chan AC et al., 1991).

La regeneración de ascorbato puede ser vía enzimática, mediante la monodihidroascorbato reductasa y la dihidroascorbato reductasa (Buettner GA et al., 1995). Otras vías son mediante interacciones con otras moléculas como el glutatión o por interacción de dos radicales semidihidroascorbato (Stadtman ER, 1991).





Una cierta actividad prooxidante ha sido observada para la vitamina C, radicando en su capacidad para reducir metales catalíticos de transición como  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ , con la toxicidad que ello implica, aunque el predominio de una actividad prooxidante o antioxidante, va a depender de las concentraciones relativas de ascorbato y metales de transición libres, mostrándose la prooxidante en condiciones de bajas concentraciones de ascorbato y relativamente altas de metales libres (*Buettner GA et al., 1995*). Esta actividad prooxidante se ve disminuida por interacciones con otros antioxidantes, por ejemplo se ha observado que el urato protege de la oxidación por ácido ascórbico mediante el atrapamiento de metales catalíticos (*Sevanian A et al., 1991*).

#### 2.8.2.5.- Ácido úrico.

El ácido úrico es producido vía actuación xantina deshidrogenasa y/o oxidasa. A un pH fisiológico este compuesto, mayoritariamente es ionizado a urato (*Simic MG et al., 1989*).

La reacción del urato con radicales libres varía en base al radical en cuestión. Con el radical  $\text{OH}^\cdot$  interacciona directamente, pero con una reactividad muy baja y similar a la de gran cantidad de moléculas encontradas en organismos vivos, siendo realmente su relación con este radical indirecta, por atrapamiento de metales catalíticos de transición (*Simic MG et al., 1989*).

Se ha mostrado, en diversos estudios, su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, fundamentalmente por atrapamiento de metales de transición y en menor grado por su reacción con radicales peroxilo (*Halliwell B, 1995*).

#### **2.8.2.6.- Glutación.**

El glutación es un tripéptido formado por glutamina, cistina y glicina. Se encuentra en prácticamente todas las células, presentando un importante papel como antioxidante intracelular y en el líquido de recubrimiento epitelial (*Ramón JR, 1993*).

El sistema glutación reducido-oxidado utiliza hidroperóxidos para oxidar el glutación reducido. Existen evidencias crecientes de que es necesario un fino balance entre GSH/GSSG para un adecuado mantenimiento de la salud (*Ramón JR, 1993*).

El glutación proporciona el poder reductor necesario para la conversión de dehidroascorbato a ascorbato (*Meister A, 1994*) y de radical tocoferoxilo a tocoferol.

Además de su papel de sustrato en el ciclo redox del glutación, este reacciona directamente con el  $O_2^-$  y  $OH^-$  y radicales libres orgánicos (*Romero Alvira D et al., 1992*).

#### **2.8.2.7.- N-acetilcisteína.**

La N-acetilcisteína (NAC) es un fármaco bien tolerado, con escasa toxicidad, que reacciona con los reactivos intermediarios de oxígeno e

incrementa los niveles intracelulares de glutatión en distintos tejidos corporales (*Hunnighake G et al., 1995; Macnee W et al., 1995; Buhl R et al., 1996*). La NAC inhibe la acción del factor de transcripción nuclear kB (NFkB), debido al potencial rédox que mantiene dentro de la célula (*Staal FJT, 1990*). El NFkB es un factor de transcripción nuclear citoplasmático que puede ser inducido por diversos radicales libres, como el peróxido de hidrógeno y algunas citoquinas : TNF- $\alpha$  e IL-1; tras su activación, induce la expresión en el núcleo de un variado número de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria (*Peña de la A et al., 1997*).

Se ha comprobado in vitro, sobre linfocitos de sangre periférica, que la NAC inhibe la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ .

#### **2.8.2.8.- Ferritina, hemosiderina, transferrina y ceruloplasmina.**

Estas proteínas evitan la formación del radical hidroxilo (OH $\cdot$ ), originado principalmente por la presencia de iones de transición libres como el hierro o el cobre (reacción de Fenton o de Haber-Weiss). Así, en el interior de la célula, este hecho se controla en condiciones normales mediante la asimilación del hierro libre por proteínas de unión como la ferritina y hemosiderina (*Romero D et al., 1989; Casado JA et al., 1996; Ballester M et al., 1996*). En el ambiente extracelular también se evita la presencia de estos iones de forma libre mediante las proteínas transferrina y ceruloplasmina, que, en condiciones normales, solo están al 30% de saturación haciendo que las concentraciones de hierro sean prácticamente nulas. La ceruloplasmina, también actúa captando iones de cobre libre (*Krsek JA et al., 1993*).

### **3.- OXIDANTES/ANTIOXIDANTES EN LA FIBROSIS PULMONAR.**

Como ya se ha visto con más detalle en apartados anteriores, en la fibrosis pulmonar, existe un aumento de oxidantes a nivel del epitelio pulmonar. Dichos oxidantes parecen jugar un importante papel en la patogénesis de esta enfermedad (*MacNee W et al., 1995; Schins RP et al 1999; Mastruzzo C et al., 2002; Yucesoy B et al. 2005*).

Los leucocitos, así como células inflamatorias (principalmente macrófagos y neutrófilos), activadas en el tracto respiratorio inferior, son las encargadas de liberar gran cantidad de radicales libres de oxígeno. Los oxidantes, por mecanismos ya expuestos, han sido implicados en la lesión del epitelio pulmonar; dicha lesión contribuye a la producción y evolución del pulmón hacia la fibrosis (*Hunnighake G et al., 1995; MacNee W et al., 1995; Buhl R et al., 1996; Mastruzo C et al., 2002*).

#### **3.1.- ANTIOXIDANTES.**

En el pulmón fibrótico, se ha demostrado un importante desbalance entre oxidantes/antioxidantes, a favor de los primeros. Los antioxidantes son de vital importancia para la integridad celular y desempeñan importantes funciones tanto a nivel intracelular como extracelular (*Buhl R et al., 1996; Yucesoy B et al. 2005*).

Entre los sistemas antioxidantes enzimáticos intracelulares a nivel pulmonar, se encuentran: superóxido dismutasa (SOD), catalasa y el glutatión (GSH) (utilizando los enzimas glutatión reductasa y glutatión peroxidasa) (*Yucesoy B et al, 2005*). Entre los antioxidantes no enzimáticos

intracelulares están: vitamina E, vitamina A y ácido ascórbico. Los antioxidantes extracelulares presentes en el epitelio del tracto respiratorio inferior son: catalasa, SOD, albúmina, ceruloplasmina, transferrina, GSH y vitaminas (E, A y C) (*MacNee W et al., 1995; Buhl R et al., 1996*).

La molécula antioxidante predominante y más importante, tanto a nivel intracelular como extracelular es el glutatión (GSH). Está presente en una concentración 100 veces superior en el tracto respiratorio inferior que en el plasma. Se ha demostrado un nivel más bajo, a nivel de tracto respiratorio inferior, en paciente afectos de fibrosis pulmonar; aunque los niveles de GSH no se correlacionan con la severidad de la lesión (*Kinnula VL et al., 2003; Tamer L et al, 2004; Kinnula VL et al., 2005*).

Concentraciones de GSH normales a nivel pulmonar (500 M), pueden suprimir la mitogénesis y proliferación de los fibroblastos, e incluso, puede jugar un importante papel en los cambios anatomopatológicos que se desarrollan en la fibrosis pulmonar (*MacNee W et al., 1995*).

Buhl R et al. utilizaron como terapia para la fibrosis pulmonar, la inhalación de glutatión reducido (vía aerosol), con el fin de aumentar los niveles de este antioxidante en el tracto respiratorio inferior, llegando a la conclusión de que la terapia con GSH aerosol, no solo normalizaba los niveles de GSH, sino que también se consiguió una reducción de los niveles de oxidantes (*Buhl R et al., 1996*).

Especial importancia en la terapia antioxidante de la fibrosis pulmonar juega la N-acetilcisteína (NAC). Se ha demostrado que la NAC administrada vía oral a altas dosis (600 mg x 3 tomas/día), podría aumentar

los niveles de glutatión, al menos transitoriamente, a nivel del tracto respiratorio inferior y plasma (*MacNee W et al., 1995; Lois M et al., 1999; Kinnula VL et al., 2005*).

Las propiedades de la NAC, así como sus principales mecanismos de acción han sido expuestos con detenimiento en apartados anteriores.

Una de las perspectivas de futuro mas acentuadas para el tratamiento de la fibrosis pulmonar, parece ser la creación de sustancias capaces de modular el estado oxidativo de las células afectas por dicho estrés (*Kinnula VL et al., 2005*).



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



La fibrosis pulmonar es un proceso crónico que afecta progresivamente el intersticio y el espacio alveolar pulmonar hasta llegar a producir, según su intensidad, insuficiencia respiratoria severa e incluso la muerte.

Para inducir la fibrosis pulmonar en animales de experimentación se han utilizado diversos modelos. Hemos optado por el modelo de fibrosis pulmonar mediante inhalación de talco ya que, aunque escaso en la bibliografía, las lesiones anatómicas y las manifestaciones clínicas que provoca son muy similares a las que se observan en enfermos con fibrosis pulmonar. A esto añadimos nuestra experiencia previa con esta técnica que nos garantizaba el lograr uno de los objetivos marcados, provocar una lesión pulmonar predecible.

Este hecho unido a la ausencia de un estudio en animal de experimentación que analice el estrés oxidativo en relación a la fibrosis pulmonar inducida por talco, nos ha llevado a plantear el presente trabajo buscando los siguientes objetivos.

1º Evaluar el estrés oxidativo generado por la fibrosis pulmonar inducida por talco.

2º Analizar el comportamiento de los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) provocado por dicho estrés.

3º Evaluar el balance estrés oxidativo/mecanismos antioxidantes al suministrar una terapia antioxidante. Hacemos un primer intento utilizando

tocoferol a una dosis de 200 UI/día como primer paso en esta línea de investigación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.**

Los reactivos y solventes empleados para las determinaciones analíticas fueron adquiridos a los laboratorios Fluka (St. Louis; MO, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, MO, USA), Panreac (Barcelona, España) y Boehringer (Manheim, Alemania), siendo todos ellos de la máxima calidad disponible en el mercado.

Los patrones para las determinaciones de vitaminas y proteínas fueron suministradas por SIGMA y FLUKA. Los homólogos de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> fueron cortesía de Eisai Co, Tokio, Japón.

Los reactivos y solventes orgánicos de calidad HPLC se adquirieron de los laboratorios MERCK.

## **2.- ANIMALES.**

El estudio ha sido llevado a cabo con un total de treinta ratas todas hembras de la raza wistar de dos meses de edad y con un peso inicial comprendido entre 70 y 80 gr, las cuales fueron divididas en tres grupos de diez ratas cada uno.

Dichos animales se obtuvieron del laboratorio animal de la Universidad de Granada, fueron alojadas, durante los treinta días de duración del experimento, en jaulas colectivas de cinco ratas cada una de ellas. Tuvieron libre acceso al agua y a la comida que fue suministrada “ad libitum”.

Las jaulas se encontraban en una habitación termorregulada a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas de luz (8:00 horas- 20:00 horas) y 12 horas de oscuridad (20:00 horas-8:00 horas).

### **3.- DIETA.**

Durante los treinta días de duración del estudio, todos los animales fueron alimentados de igual manera con una dieta de mantenimiento (Pienso A.04 de PANLAB S.L. Barcelona, España). En la tabla 1 se muestra la composición de dicha dieta.

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Humedad	12.40
Proteína	15.50
Fibra	3.80
Grasa	2.90
Minerales	5.30
Cloruro sódico (ppm)	-
Calcio (ppm)	8600
Fósforo (ppm)	5900
Almidón (ppm)	44.70

*Tabla 1.- Composición de la dieta.*

### **4.- DISEÑO EXPERIMENTAL.**

El protocolo del presente trabajo experimental, fue aprobado por el comité ético de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología; los animales fueron manipulados de acuerdo a las directrices para el cuidado y



manejo de animales de laboratorio de la Sociedad Española para Ciencias de Laboratorio Animal.

Las ratas, objeto de estudio, fueron divididas al azar en los siguientes grupos experimentales:

#### **4.1.- GRUPO CONTROL O BASAL (FC):**

Este grupo permaneció, durante el periodo de treinta días, en las condiciones anteriormente expuestas.

#### **4.2.- GRUPO DE FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA POR TALCO (FT):**

Presenta iguales características que el anterior y, además, a las ratas de dicho grupo se les indujo una fibrosis pulmonar.

Para la producción de dicha fibrosis pulmonar, las ratas fueron introducidas, durante 2 horas y 30 minutos, veinte días consecutivos entre las 9 horas y las 12 horas de la mañana, en una jaula de cristal, la cual estaba conectada a un circuito de producción de “polvo de talco” accionado por un compresor (figura 1). Tras este periodo diario, las ratas eran introducidas de nuevo en su jaula de referencia.

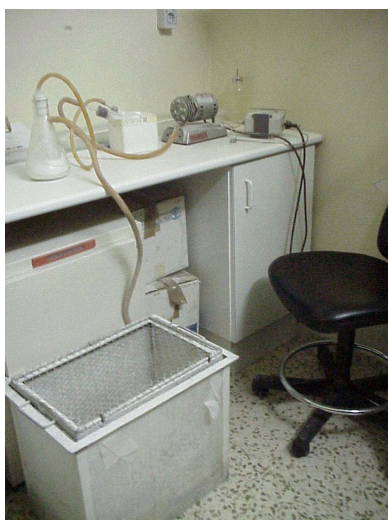
#### **4.3.- GRUPO DE FIBROSIS PULMONAR MÁS INGESTA DE ANTIOXIDANTE (FTA):**

Fue sometido a iguales condiciones que el grupo anterior. Ambos grupos (2º y 3º), se introducían simultáneamente en la jaula de cristal para

la inhalación de talco y permanecían el mismo periodo de tiempo. Para lograr distinguir las ratas de cada grupo, las de este último fueron marcadas en la base del rabo con un rotulador marca “Uni Prockey®” (figura 2).

Previamente a la introducción de las ratas de este último grupo en la jaula de cristal, se las sometía diariamente a la ingesta de vitamina E (acetato de dl- $\alpha$ -tocoferol) a dosis de 200 mg/día (equivalente a 200 U I de vitamina E). Dicha cantidad de sustancia antioxidante era introducida directamente en el estómago de la rata mediante una sonda rígida de 8,5 cm de longitud y borde romo para no provocarle ninguna alteración a nivel de tracto gastro-intestinal alto (figura 3 y 4).

Tras diez días de adaptación de las treinta ratas, los dos últimos grupos (FT y FTA) fueron sometidos, como ya ha sido comentado, a la inducción de fibrosis pulmonar y la ingesta de vitamina E (en grupo FTA), durante un periodo de veinte días.



*Figura 1.*



*Figura 2.*



Figura 3.

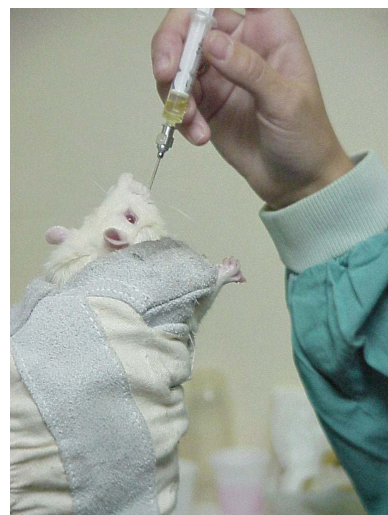


Figura 4.

## **5.- SACRIFICIO DE ANIMALES Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.**

Tras el periodo anterior, los animales fueron sacrificados mediante desangrado por canulación de arteria carótida (figuras 5 y 6). Todos fueron sacrificados de 11 horas a 13 horas para así evitar posibles interferencias con el ritmo circadiano.

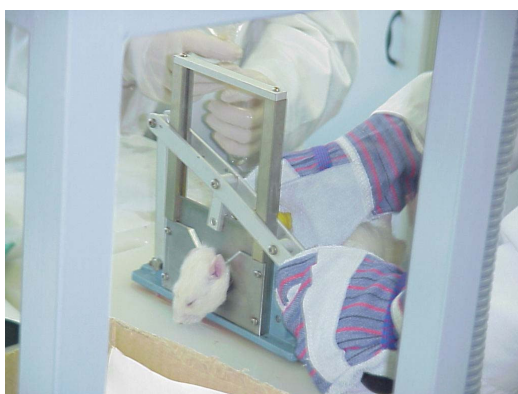


Figura 5.

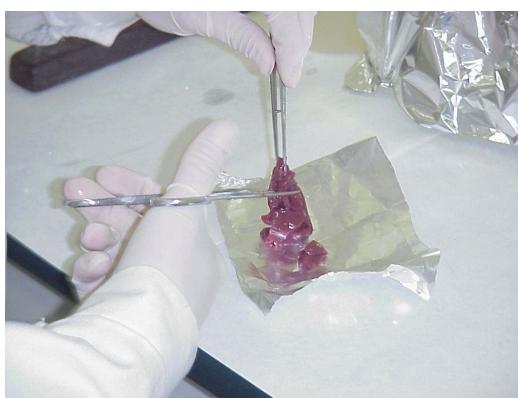


Figura 6.

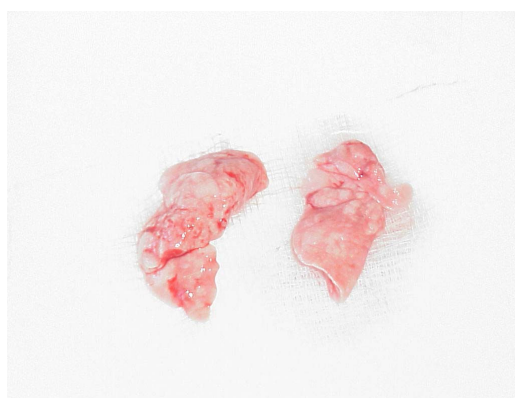
Los órganos utilizados en el estudio fueron hígado y pulmón, los cuales, una vez extraídos, son lavados en suero fisiológico, secados y

pesados (figuras 7 y 8). Uno de los pulmones fue trasladado al Departamento de Anatomía Patológica para comprobar el grado de fibrosis de los mismos.

El hígado fue procesado el mismo día de la extracción, mientras que el pulmón se envolvió en papel de aluminio y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesado.



*Figura 7.*



*Figura 8.*

## **6.- OBTENCIÓN DE PLASMA Y CÉLULAS SANGUÍNEAS.**

La sangre, inmediatamente tras su extracción, se centrifugó a 2500 x g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga refrigerada de mesa Beckman modelo GS-6R (Beckman Fullerton, CA, USA). Tras la centrífuga, aparecen tres niveles que, de arriba hacia debajo del tubo de ensayo, son:

a) Plasma: Se repartió en viales eppendor, congelándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

b) Células blancas: No se utilizaron para el presente trabajo de investigación.

c) Células rojas: Estas últimas fueron desechadas.

## **7.- PROCESAMIENTO DE LOS ÓRGANOS Y OBTENCIÓN DE DISTINTAS FRACCIONES CELULARES.**

El método utilizado para la obtención de mitocondrias es el de Fleischer S et al. (1979).

Los órganos de estudio son resuspendidos en tampón de sacarosa en relación 1,5 peso de órgano/6 volumen de tampón, pasados por una cuchilla (POLYTRON, modelo PT 10-35) para un mejor fraccionamiento de los mismos. Finalmente se homogenizan en un homogenizador automático, consistente en un póter con pistón de teflón, tras lo cual son centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos, a 4°C, en una centrífuga J2-21, con un rotor JA-20.

El sobrenadante obtenido es filtrado para una mejor eliminación de la grasa y restos de tejido, y se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos, a 4°C, durante 20 minutos, tras lo cual el pélet es retirado, mantenido en hielo picado y envuelto en papel de aluminio. El sobrenadante, obtenido en esta última centrifugación, es pasado a otro tubo y centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos, a 4°C; en esta centrifugación es el sobrenadante el que se mantiene en hielo picado y en oscuridad, mientras que el pélet se une al pélet anterior, resuspendiéndose en 25 ml de tampón sacarosa y centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. El pélet obtenido en esta centrifugación representa la fracción mitocondrial, la cual es

resuspendida en tampón de sacarosa, repartido en viales eppendorf y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su estudio.

El sobrenadante separado es ahora centrifugado en una ultracentrífuga (marca Beckman, modelo L8-M) a  $105000 \times g$  durante 45 minutos para obtener la fracción microsomal (pélet) y la citosólica (sobrenadante). Ambas fracciones son congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En el caso del hígado, el tampón utilizado en la homogenización y en la primera centrifuga es un tampón de sacarosa con albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA).

## **8.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN PLASMA.**

### **8.1.- DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS REACTIVAS CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EN PLASMA.**

Se ha empleado el método de Orrenius S et al. (1977), el cual se basa en la medición espectrofotométrica de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), es un método que aunque antiguo y no muy preciso o exacto, al ser de alta sensibilidad pero poca especificidad, se sigue hoy en día utilizando como un indicador aproximativo de los niveles de malondialdehído (MDA) presentes en las muestras y por lo tanto de los niveles de peroxidación lipídica de las muestras.

Se ha partido de 100  $\mu\text{l}$  de muestra, a los cuales se le ha adicionado 0,75 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,8 % y 0,75 ml de acético al 20% en agua. Se agitan e incuban a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, tras lo cual son

centrifugados a 3000 rpm para que precipiten las proteínas (por acción del acético) durante 15 minutos.

La reacción MDA-TBA da lugar a una pigmentación rojiza que se lee espectofotométricamente a 532 nm.

## **8.2.- DETERMINACIÓN DE COENZIMA Q, VITAMINA E Y RETINOL PLAMÁTICO POR HPLC.**

La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, siguiendo el método de Litarru GP et al. (1991).

Para la extracción previa, se parte de 0,5 ml de plasma, los cuales son mezclados con 0,5 ml de laurilsulfato sódico al 2%, tras lo cual se mezcla y se ponen 2 ml de solución de etanol:isopropanolol (95:5) y 5 ml de hexano; la mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada a 1000-1500 rpm durante 10 minutos. La fase de hexano es retirada, adicionándose al tubo primitivo otros 5 ml de hexano y repitiéndose la centrifugación y extracción posterior.

Ambas fases de hexano son desecadas bajo corriente de nitrógeno y resuspendidas en 100 µl de fase móvil utilizada, pinchándose 20 µl de esta resuspensión en el HPLC y consiguiéndose así la separación cromatográfica del coenzima Q, retinol y vitamina E (figura 9).

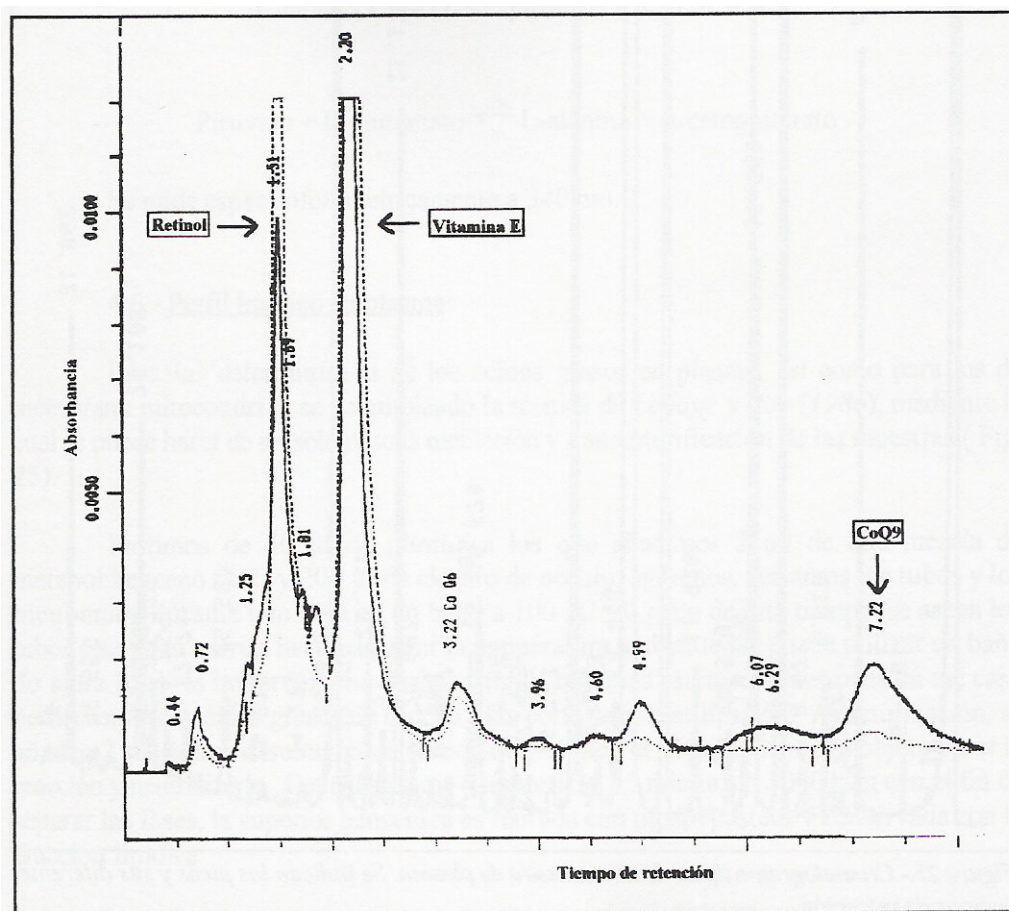


Figura 9.- Cromatograma de HPLC de una muestra de plasma. Se indican los picos identificados como retinol, vitamina E, y coenzima Q<sub>9</sub>, así como sus tiempos de retención.

El instrumento utilizado fue un Beckman Gold Sistem, equipado con un detector Diode Array 168 y una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0,46 cm, con precolumna de igual relleno que la columna principal.

La fase móvil empleada ha sido etanol:agua (97:3), siendo la velocidad de flujo de 1 ml/minuto a 25° C y la duración del método 10 minutos. En el mismo pinchazo hemos detectado el coenzima Q<sub>9</sub>,  $\alpha$ -tocoferol y retinol del plasma de nuestras ratas.

Las concentraciones fueron determinadas mediante una curva patrón realizada a partir de estándares puros, pinchados a concentraciones cada



vez mayores, la concentración de los patrones se averiguó espectrofotométricamente de forma previa a su empleo para la curva patrón.

Estos patrones se emplearon igualmente para identificar los tiempos de retención de los picos de nuestros cromatogramas.

## **9.- PARÁMETROS DETERMINADOS EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y PULMÓN.**

### **9.1.- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA PROTEÍNA TOTAL.**

La cuantificación del contenido proteico de la fracción mitocondrial de la célula, ha sido realizada utilizando el método de Lowry OH et al. (1951).

Se parte de 5µl de muestra, a la cual se adiciona 5 ml de reactivo de Biuret, se agita y se espera 15 minutos, tras los cuales se le adicionan 0,5 ml de reactivo de Folin, se agita y se espera 20 minutos, manteniendo los tubos en la oscuridad. La reacción es leída a una absorbancia de 640 nm.

Para el cálculo de concentración existente se ha utilizado una curva patrón preparada con albúmina sérica.

### **9.2.- DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS CON EL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).**

Se ha utilizado el mismo método empleado en plasma (*Orrenius S et al., 1977*). Partiendo igualmente de 100 µl de muestra.

### **9.3.- CUANTIFICACIÓN DEL NIVEL DE HIDROPERÓXIDOS EXISTENTE EN MEMBRANAS.**

La cuantificación de hidroperóxidos en mitocondrias y microsomas ha sido llevada a cabo utilizando el método de Jiang ZY et al. (1992), con ligeras modificaciones. La técnica está basada en la rápida formación de hidroperóxidos mediado por la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  en medio ácido. El  $\text{Fe}^{3+}$  forma un cromóforo con el xilenol orange que absorbe a 560 nm.

Se emplea el reactivo de Fox, el cual está compuesto por ácido sulfúrico 250 nM, BTH, xilenol orange, amoniosulfato amónico ferroso y metanol. El reactivo se protege de la luz, almacenándose en una botella oscura.

Se llevó a cabo una determinación basal ( $T_0$ ), la cual permite conocer el nivel de hidroperóxidos existentes en las muestras. Para ello se adiciona a la muestra 0,9 ml de fox/ml de volumen final, se espera 60 minutos, manteniendo la muestra en oscuridad y se lee en espectrofotómetro a 560 nm.

La concentración de hidroperóxidos basales se calcula mediante la aplicación de la ecuación de Lamber Beer, con un cociente de extinción molar de  $4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### **9.4.- EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE UBIQUINONAS VITAMINA E Y RETINOL POR HPLC EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y PULMÓN.**

El método utilizado para la extracción de ubiquinonas (CoQ<sub>10</sub> y CoQ<sub>9</sub>) es el descrito por Kroger A (1978), mediante una mezcla de etanol:éter de petróleo (60:40). Una vez realizada la extracción son analizadas por HPLC según la técnica descrita por Battino M et al. (1990), paralelamente se ha conseguido extraer y cuantificar la vitamina E y el retinol.

Se ha partido de 2 mg de proteína, esta proteína es llevada a 0,5 ml con agua bidestilada, se adicionan 2,5 de la mezcla de etanol:éter de petróleo (60:40), la mezcla es agitada vigorosamente y centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C en una centrífuga de brazos oscilantes, para conseguir una perfecta separación y definición de las fases.

Se extrae la fase etérea superior y se guarda en frío; al tubo primitivo se le vuelve a adicionar 1ml de éter de petróleo, volviéndose a agitar y centrifugar. La fase etérea extraída en esta segunda centrifugación, es mezclada con la anterior y llevadas a secar bajo corriente floja de nitrógeno.

El extracto seco es resuspendido en 100 µl de la fase móvil a utilizar.

La separación cromatográfica es realizada mediante HPLC, usando para ello una columna Spherisorb S5 ODS I de 18 x 0.46 cm. El instrumento es el mismo utilizado en la cuantificación de ubiquinonas en plasma.

La fase móvil consiste en una mezcla etanol para HPLC: agua bidestilada (97:3), siendo la velocidad de flujo utilizada de 1 ml/min, y realizándose todas las determinaciones a 25 °C.

La cuantificación de los tres parámetros ha sido llevada a cabo mediante exploración en curvas patrón preparadas con estándares puros, cuya concentración se ha averiguado previamente mediante lectura en espectrofotómetro de las diluciones de esos patrones en solución etanólica.

## **10.- DETERMINACIONES EN CITOSOL DE HÍGADO Y PULMÓN.**

### **10.1.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA.**

La técnica utilizada sigue el método descrito por Aebi H (1984). Este método se basa en un seguimiento de la descomposición de  $H_2O_2$  y  $O_2$  mediante espectrofotometría a 240 nm como consecuencia de la actividad catalítica de la catalasa.

Para esta determinación, en una cubeta de cuarzo de 3 ml se adicionan 200  $\mu$ l de una dilución del citosol en agua bidestilada (50:950), a los que se añaden 1800  $\mu$ l de tampón fosfato 50 mM (compuesto por  $KH_2PO_4$  50 mM y  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  50 mM a pH 7.0). Se adicionan 1000  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30 mM, se agita rápidamente y se observa el descenso de absorbancia de  $H_2O_2$  a 240 nm durante un minuto a 20° C, frente a un blanco con 2800  $\mu$ l de tampón fosfato y 200  $\mu$ l de la dilución de citosol.

Para el cálculo de las unidades se recomienda el uso de una constante de reacción de 1<sup>er</sup> orden (K) ya que este es el tipo de reacción seguida por la

descomposición del  $H_2O_2$ , con concentraciones relativamente bajas de sustrato. Esto se debe a que no se puede medir la actividad enzimática a través de la saturación, debido a la formación de complejos inactivos a las concentraciones de  $H_2O_2$  de saturación.

## **10.2.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).**

Se ha utilizado la técnica de Fridovich I (1975) ligeramente modificada. El método está basado en la inhibición que ejerce la SOD sobre la reducción del citocromo c medida espectofotométricamente a 550 nm.

El citocromo c se reduce en presencia de anión superóxido, por lo cual se crea “in vitro” un sistema productor de anión superóxido, el sistema xantina-xantina oxidasa, y se observa como la SOD compite con el citocromo c por este anión superóxido a través de un descenso en la producción de citocromo c reducido.

Las lecturas se realizaron a 25° C, monitorizando la formación de citocromo c reducido durante un periodo de 2 minutos a 550 nm.

Lo primero es crear un patrón de reducción del citocromo c, para lo cual en una cubeta de 1 ml se mezclan 100  $\mu$ l de solución de citocromo c 0,1 M en tampón sin azida, 100  $\mu$ l de xantina 0,0005 M en tampón sin azida y 650  $\mu$ l de tampón carbonato/bicarbonato (compuesto por  $Na_2CO_3$  0,02 M y  $NaHCO_3$  0,02 M ajustado a pH 10). A continuación se le añade la EDTA 0,001 M y azida sódica 0,1 mM (con el fin de inhibir peroxidasas, sin que se afecte la SOD), y posteriormente se adiciona una cantidad de

xantina-oxidasa, determinada anteriormente, suficiente para obtener una reducción de citocromo c de 0,025 a 0,05 unidades de absorbancia por minuto.

Una vez determinada la cantidad de xantina-oxidasa necesaria, se procedió a la determinación de la actividad SOD de las muestras, para lo cual en una cubeta de 1 ml se adicionan 100  $\mu$ l de solución de citocromo c, 100  $\mu$ l de solución de xantina, 650  $\mu$ l de tampón carbonato/bicarbonato y 10  $\mu$ l de citosol. La reacción se dispara con la cantidad de xantina-oxidasa determinada anteriormente. Se monitoriza el descenso en la absorbancia de citocromo c reducido a 550 nm durante 2 minutos.

Los resultados se expresan como unidades de actividad por mg de proteína. Una unidad de actividad correspondiente a una inhibición del 50% de la reducción del citocromo c.

### **10.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).**

Se ha seguido la técnica descrita por Flohe L et al. (1971). El método se fundamenta en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa que continuamente es reducido por un exceso de glutatión reductasa activa y NADPH presentes en la cubeta. La consecuente oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> es monitorizada fotométricamente a 340 nm y a 37° C.

La reacción que interesa es la parte enzimática (interviene la glutatión peroxidasa) dependiente de hidroperóxidos, por lo que hay que

eliminar la independiente de hidroperóxidos y la reacción no enzimática (no interviene la glutatión peroxidasa).

Para la citada determinación se mezclan 700 µl de tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7.0 (al tampón se le adicionó EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM), 100 µl de glutatión reductasa (2,4 U/ml en tampón sin azida), 100 µl de NADPH 10 mM en una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 0,1%, 100 µl de glutatión reducido 10 mM en tampón sin azida y 5 µl de una dilución 90:10 (agua:citosol) de citosol de hígado o 20 µl de citosol de pulmón.

Se incuba a 37° C durante 3 minutos, tras los cuales se trasladan a una cubeta de 1 ml y se adicionan 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, que dispara la reacción, monitorizando el descenso de NADPH a 340 nm durante 5 minutos en presencia de un blanco con igual contenido salvo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El descenso no enzimático se elimina haciendo otra lectura en la que la muestra es reemplazada por un tampón y la lectura se realiza frente a un blanco sin muestra ni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, monitorizándose igual que en el caso anterior. El valor obtenido en esta determinación se resta al obtenido en la determinación anterior obteniéndose así el descenso enzimático dependiente del peróxido que es el que interesa. El resultado se expresa en unidades de actividad/ mg de proteína.

#### **10.4.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN REDUCTASA (GR).**

Se utilizó el método descrito por Carlberg I et al. (1995). El principio de este método es similar al anterior, pero en esta actividad se ha partido de

un exceso de glutatión oxidado que es reducido por la glutatión reductasa presente en la muestra con la consecuente oxidación de NADPH, la cual es monitorizada a 340 nm.

Esta reacción es fundamental para mantener los niveles de glutatión reducido en el organismo, el cual es un importante agente reductor.

Para la determinación se utilizaron 50  $\mu$ l de citosol, adicionando 2875  $\mu$ l de tampón fosfato potásico 0,2 M a pH 7.0 (se le adicionó al tampón EDTA 2mM y azida sódica 1mM) y 50  $\mu$ l de NADPH 2 mM en TRIS/ClH 10 mM y pH 7,0. La mezcla se incubó a 37° C durante 2 minutos.

Tras la incubación se pasaron a una cubeta y se le adicionó 100  $\mu$ l de glutatión oxidado 20 mM en tampón sin azida, el cual disparó la reacción monitorizando la oxidación de NADPH a 340nm durante 3 minutos a 37°C.

La actividad específica de la glutatión reductasa se expresa como unidades de actividad/mg de proteína. Una unidad de actividad se define como la proporción de enzima que cataliza la reducción de un  $\mu$ M de NADPH por minuto.

## **11.- ESTUDIO HISTOLÓGICO.**

Los fragmentos pulmonares destinados a tal fin, una vez lavados con suero fisiológico y fijados con formol al 10%, se tallaron y fueron incluidos en parafina con un procesador automático, efectuándose cortes, con un microtomo tipo Minot, de unas 5  $\mu$ m. Las preparaciones fueron teñidas



posteriormente con Hematoxilina-eosina de Harris, Tricoma de Gramard y Sudan III.

Las observaciones fueron completadas con luz polarizada.

Otros fragmentos pulmonares fueron incluidos en glutaraldehído y adecuadamente procesados, como para si microscopía electrónica se tratara, con acetona, acetato de uranilo, óxido de propileno y por último inclusión con resina de EPON, para finalmente efectuar cortes con ultramicrotomo LKB. Con este proceder se obtuvieron cortes semifinos para estudio a gran aumento.

## **12.- EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO REALIZADO.**

Las determinaciones, en general, han sido realizadas por duplicado, dando como valor la media de las dos determinaciones. A su vez se ha realizado un tratamiento estadístico básico en cada uno de los grupos y parámetros, por lo que los resultados se expresan como media  $\pm$  error estandar de la media para cada grupo y parámetro estudiado.

A los resultados obtenidos se les aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov que demostró que la distribución de contraste es la normal.

Para averiguar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se ha aplicado un análisis de la varianza (ONE WAY), posteriormente para ver las diferencias grupo a grupo se ha aplicado un test post hoc, el test de Bonferroni, con un grado de significación del 95 %.

Todo el tratamiento estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS/PC para windows, versión 10.0, en español.

### **13.- MÉTODOS BIBLIOGRÁFICOS.**

La búsqueda bibliográfica se realizó mediante sistemas de Internet, recogidas por la National Library of Medicine (U.S. Department of Health & Human Services), a través del servicio Pub-Med “on line”, sistema que recoge y proporciona el acceso a unas 12 millones de citas de MEDLINE desde mediados de los años '60. Pub-Med incluye enlaces a muchas otras páginas web que proporcionan los artículos completos del texto y otros recursos relacionados.

La búsqueda se realizó mediante la estrategia de referencias cruzadas. Se utilizaron los términos anglosajones:

*Lung, pulmonary fibrosis, lipid peroxidation, vitamin E, antioxidants, prooxidant, coenzyme Q, oxidative stress, vitamin A, superoxide dismutase, catalase, malondialdehyde, hidroperoxides, glutathion peroxidase.*

Se accedió a la versión *on-line* de aquellos artículos disponibles y el resto se solicitó a la hemeroteca de la Facultad de Medicina, perteneciente a la Biblioteca de Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.



## **RESULTADOS**





Los resultados del presente trabajo quedan expuestos de acuerdo con el siguiente orden:

En primer lugar, se presentan los resultados generales entendiendo por tales los pesos de las ratas a la hora de sacrificarlas, así como los pesos de sus hígados y pulmones.

En segundo lugar se presentan los resultados en plasma, mitocondrias de hígado, citosol de hígado, mitocondrias de pulmón y, por último, en citosol de pulmón, de los parámetros anteriormente analizados en el capítulo de Material y Métodos.

La presentación de los resultados del estudio estadístico realizado queda expuesto de la siguiente forma:

Cuando se analizan los parámetros en plasma y en citosol, se exponen en primer lugar los resultados del análisis de la varianza (ANOVA). Si con la realización de dicho estudio se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se pasará a exponer los resultados del análisis intergrupos (2 a 2) (estudio post hoc aplicando el test de Bonferroni), como quedó expresado en el capítulo de Material y Métodos. Si el estudio de la ANOVA no detectó la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, no serán presentados los resultados del estudio post hoc.

Los parámetros estudiados en mitocondrias de hígado y pulmón, son analizados tanto por gramos de órgano fresco como por miligramos de proteína y serán expuestos presentando directamente los resultados del estudio post hoc si el estudio ANOVA, previamente realizado, detectó

significación estadística. El motivo de presentar así los resultados de este apartado deriva del hecho que una exposición pormenorizada de cada parámetro, exponiendo los resultados de ANOVA y si procede del estudio post hoc, sería tediosa y sin interés práctico.

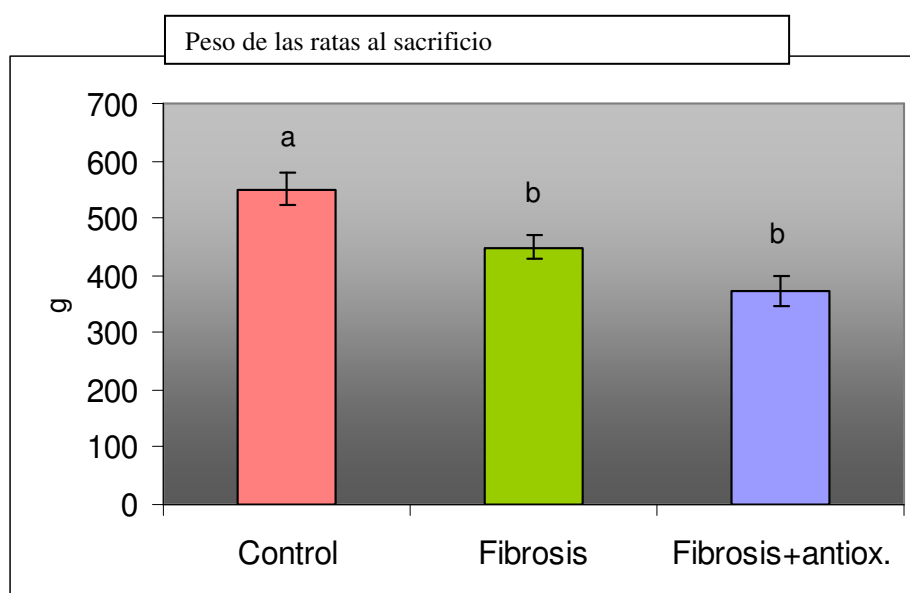


## 1.- RESULTADOS GENERALES.

### 1.1.- PESO DE LAS RATAS AL SACRIFICIO.

Al obtener los datos de los distintos grupos se obtuvieron los mayores niveles en el grupo control ( $551,16 \pm 27,75$ ), seguido del grupo fibrosis ( $449,6 \pm 19,03$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $373,5 \pm 25,95$ ) (tabla 1; anexo).

El estudio post hoc reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control con el grupo fibrosis y con el grupo fibrosis+antioxidante. No se encontraron, en cambio, diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 1).

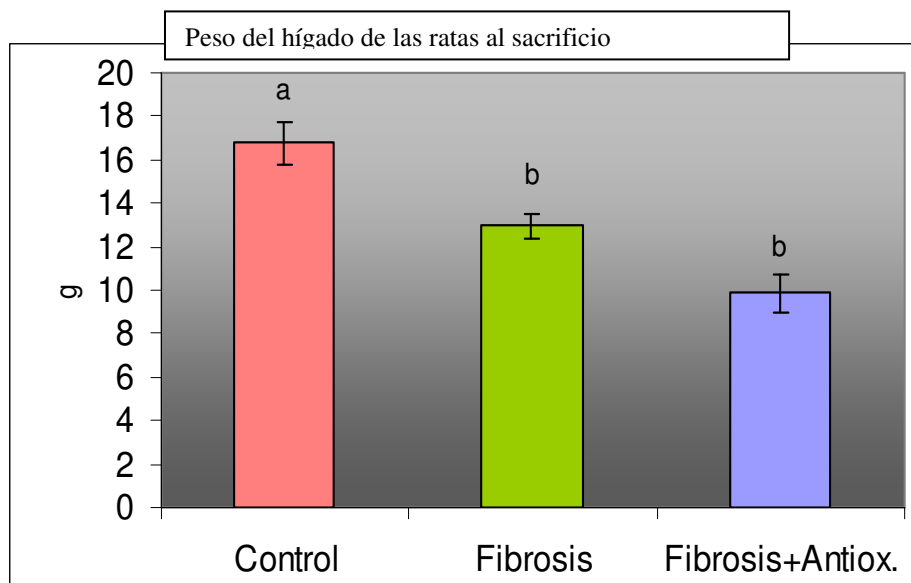


*Figura 1.- Pesos de las ratas al sacrificio. Los datos representan la media±EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).*

## 1.2.- PESO DEL HÍGADO DE LAS RATAS AL SACRIFICIO.

Los pesos de los órganos resultaron ser mayores en el grupo control ( $16,77 \pm 0,97$ ), seguidos del grupo fibrosis ( $12,96 \pm 0,58$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $9,86 \pm 0,88$ ) (tabla 1; anexo).

En el estudio post hoc se comprobó la presencia de diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis y con el grupo fibrosis+antioxidante. No existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 2).

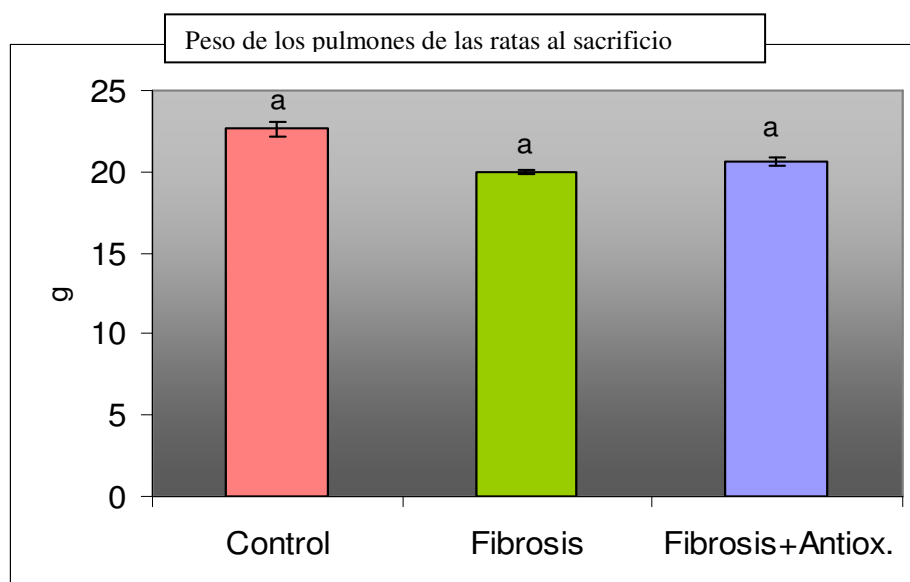


**Figura 2.-** Peso del hígado de las ratas al sacrificio. Los datos representan la media±EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ).

### 1.3.- PESO DE LOS PULMONES DE LAS RATAS AL SACRIFICIO.

Los resultados fueron muy similares para el grupo control ( $22,63 \pm 0,45$ ), grupo fibrosis ( $19,9 \pm 0,14$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $20,61 \pm 0,25$ ) (tabla 1; anexo).

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar ninguno de los grupos entre sí (figura 3).

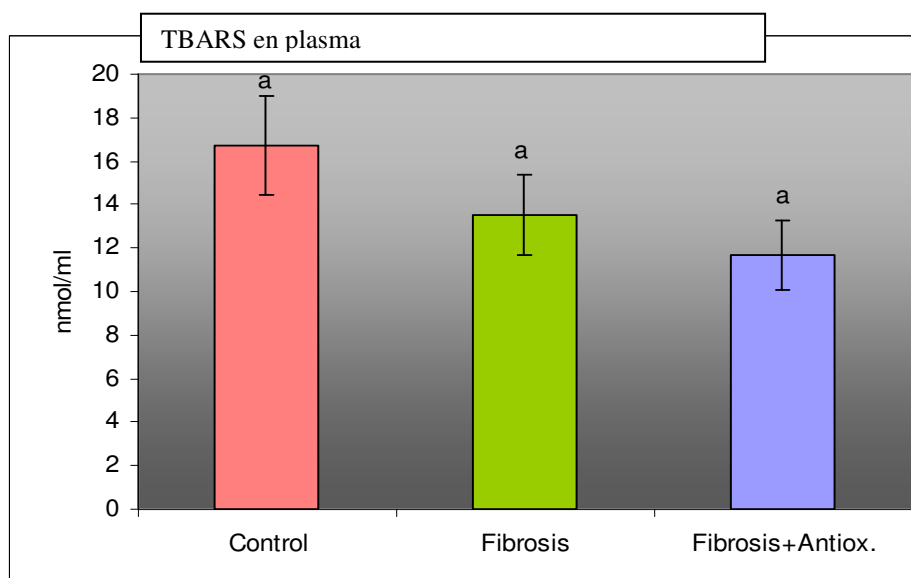


**Figura 3.-** *Peso de los pulmones de las ratas al sacrificio.* Los datos representan la media±EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 2.- RESULTADOS EN PLASMA.

### 2.1.- TBARS.

Al analizar los niveles plasmáticos de TBARS encontrados, se observaron niveles más elevados en el grupo control ( $16,70 \pm 2,26$ ), que en el grupo fibrosis ( $13,57 \pm 1,85$ ) y en el grupo fibrosis+antioxidante ( $11,68 \pm 1,57$ ) (tabla 2; anexo). Sin embargo, no se llegaron a encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos (figura 4).



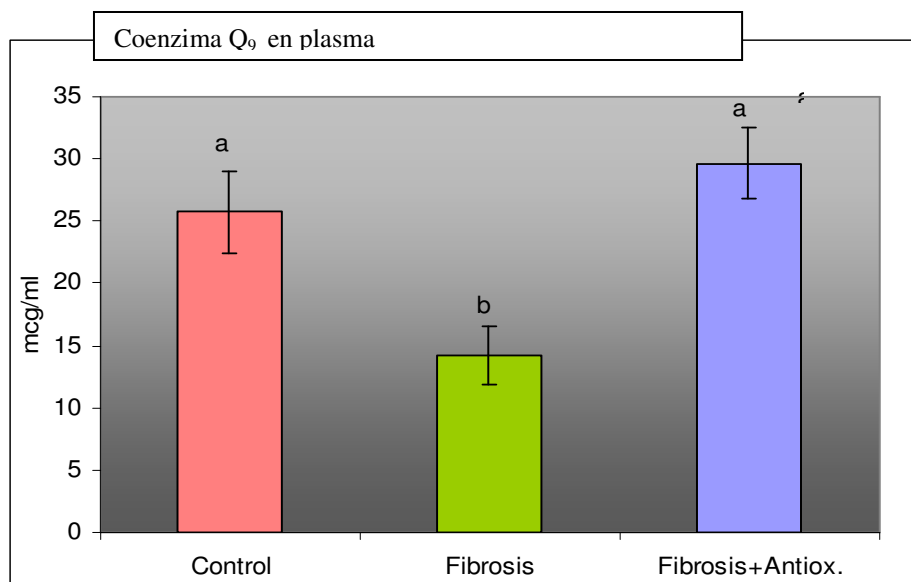
*Figura 4.- TBARS en plasma. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).*

### 2.2.- COENZIMA Q<sub>9</sub>.

Los niveles más altos se detectaron en el grupo fibrosis+antioxidante ( $29,62 \pm 2,83$ ) en comparación con el grupo control ( $25,72 \pm 3,34$ ) y el

grupo fibrosis ( $14,17 \pm 2,31$ ), llegando a existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 2; anexo).

Cuando se realizó el estudio post hoc (test de Bonferroni), se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis, así como al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 5).

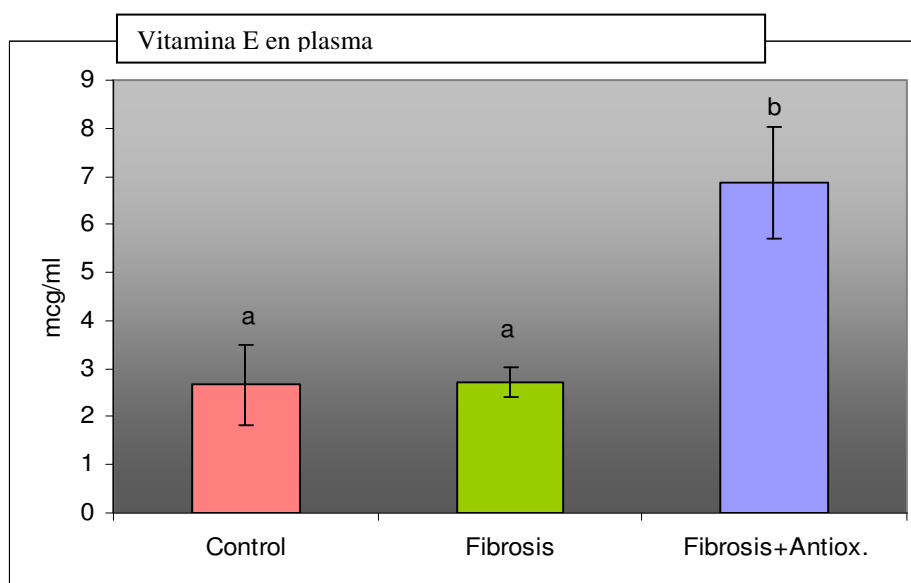


*Figura 5.- Coenzima Q<sub>9</sub> en plasma. Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas.*

### 2.3.- VITAMINA E.

En los grupos control ( $2,67 \pm 0,84$ ) y fibrosis ( $2,71 \pm 0,31$ ), los valores fueron muy similares. En el grupo fibrosis+antioxidante ( $6,87 \pm 1,15$ ) los valores resultaron ser más elevados, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 2; anexo).

Cuando se analizó el estudio post hoc, se comprobó la existencia de diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, así como al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis (figura 6).



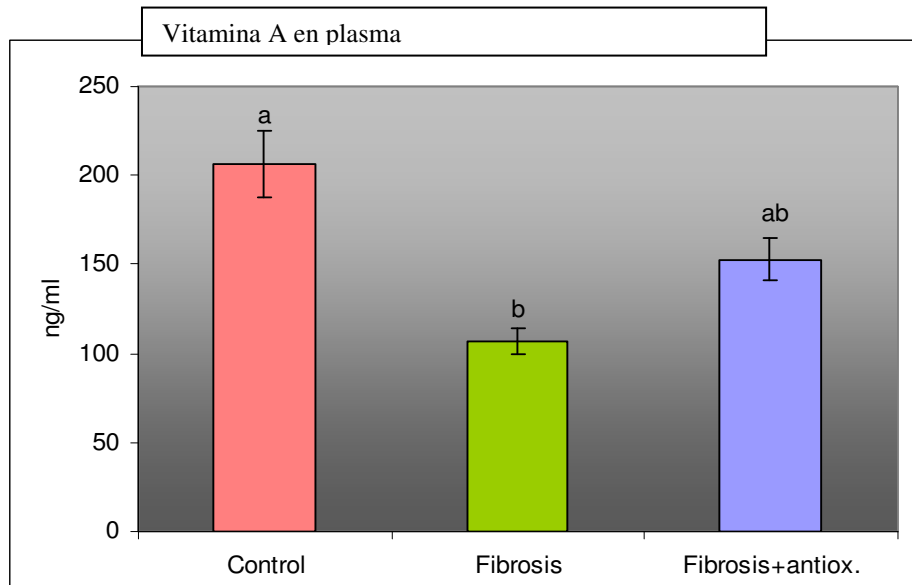
*Figura 6.-Vitamina E en plasma. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).*

#### **2.4.- VITAMINA A (RETINOL).**

Cuando se compararon los niveles plasmáticos de vitamina A entre los grupos se detectaron los siguientes resultados.

Se observaron niveles significativamente superiores en el grupo control ( $206,29 \pm 18,98$ ), en relación al grupo fibrosis ( $106,96 \pm 7,52$ ) y al grupo fibrosis+antioxidante ( $152,88 \pm 11,76$ ), existiendo diferencias estadísticamente significativas (tabla 2; anexo).

En el estudio post hoc se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis. En cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, así como al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 7).

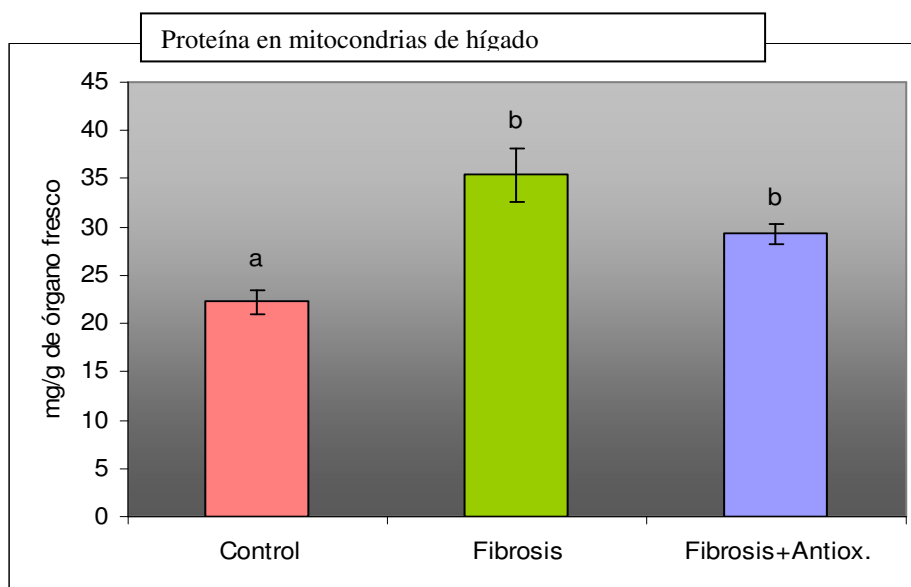


**Figura 7.- Vitamina A en plasma** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.- RESULTADOS EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO.

#### 3.1.- PROTEÍNA.

Cuando se analizaron los valores de proteína (miligramos) por gramos de hígado fresco, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $22,24 \pm 1,24$ ) con el grupo fibrosis ( $35,42 \pm 2,79$ ), así como al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante ( $29,28 \pm 1,13$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 8) (tabla 3; anexo).



**Figura 8.- Proteína en mitocondrias de hígado.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



### 3.2.- TBARS.

Al analizar los niveles de TBARS por gramos de hígado fresco, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, siendo los valores para el grupo control ( $31 \pm 4,55$ ), para el grupo fibrosis ( $55,05 \pm 10,14$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante ( $57,85 \pm 5,12$ ).

Análogamente, al expresar los resultados por miligramos de proteína, tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los grupos control ( $3,25 \pm 0,32$ ), fibrosis ( $2,52 \pm 0,25$ ) y fibrosis+antioxidante ( $2,53 \pm 0,19$ ) (figura 9) (tabla 3; anexo).

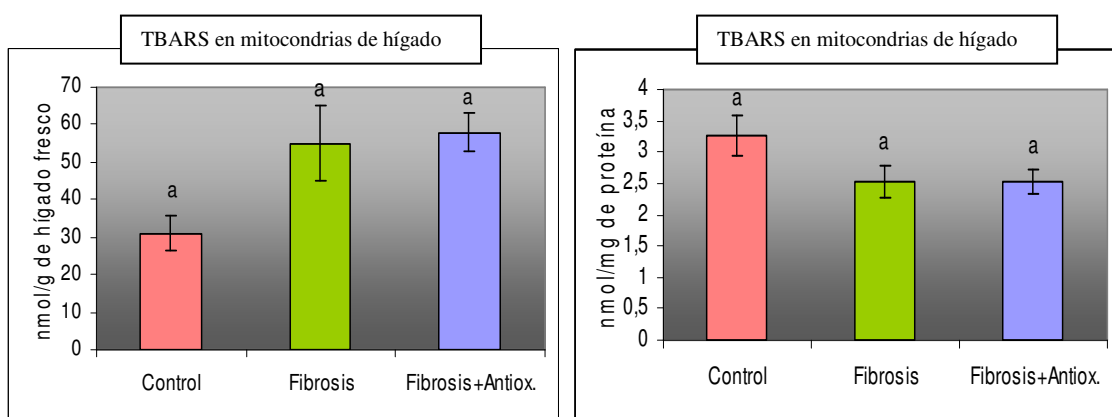


Figura 9.- TBARS en mitocondrias de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.- HIDROPERÓXIDOS BASALES ( $T_0$ ).

Cuando se compararon los niveles de hidroperóxidos basales ( $T_0$ ) por gramos de hígado fresco, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo los valores para el grupo control ( $132 \pm 20,15$ ), ligeramente inferiores al grupo fibrosis ( $149,34 \pm 22,49$ ) y al grupo fibrosis+antioxidante ( $177,18 \pm 16,12$ ) (figura 10) (tabla 3; anexo).

Al considerar los resultados referidos a miligramos de proteína, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control ( $11,99 \pm 0,34$ ) con el grupo fibrosis ( $6,92 \pm 0,45$ ), así como cuando se comparó el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante ( $7,55 \pm 0,38$ ). Al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 10) (tabla 3; anexo).

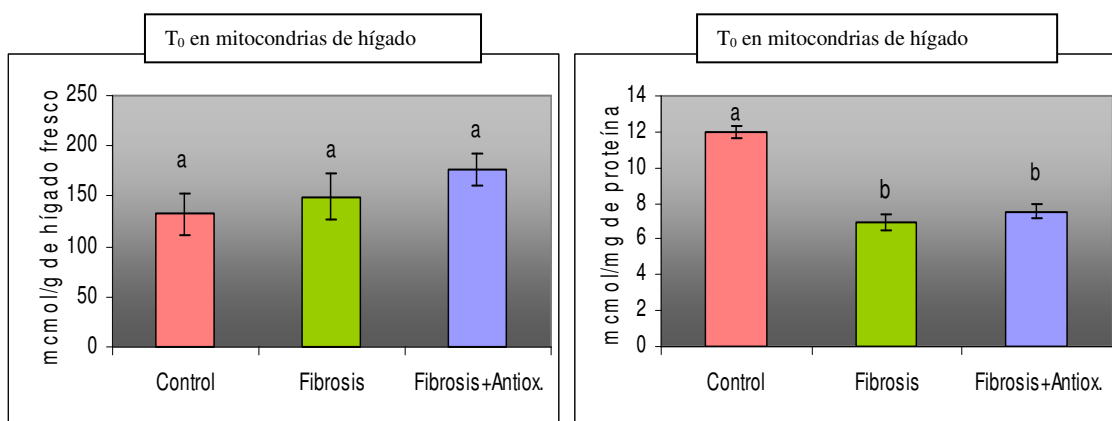


Figura 10. -T<sub>0</sub> en mitocondrias de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.4.- COENZIMA Q<sub>0</sub>.

Cuando se expresaron los resultados referidos a gramos de hígado fresco, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control ( $708,76 \pm 168,85$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $1764,52 \pm 216,86$ ), así como al analizar el grupo fibrosis ( $807,69 \pm 103,62$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante (tabla 3; anexo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control y el grupo fibrosis (figura 11).

En valores referidos a miligramos de proteína, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis

( $38,41 \pm 4,06$ ) con respecto al grupo fibrosis+antioxidante ( $76,44 \pm 8,75$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $61,32 \pm 5,86$ ) con los otros dos grupos del estudio (figura 11) (tabla 3; anexo).

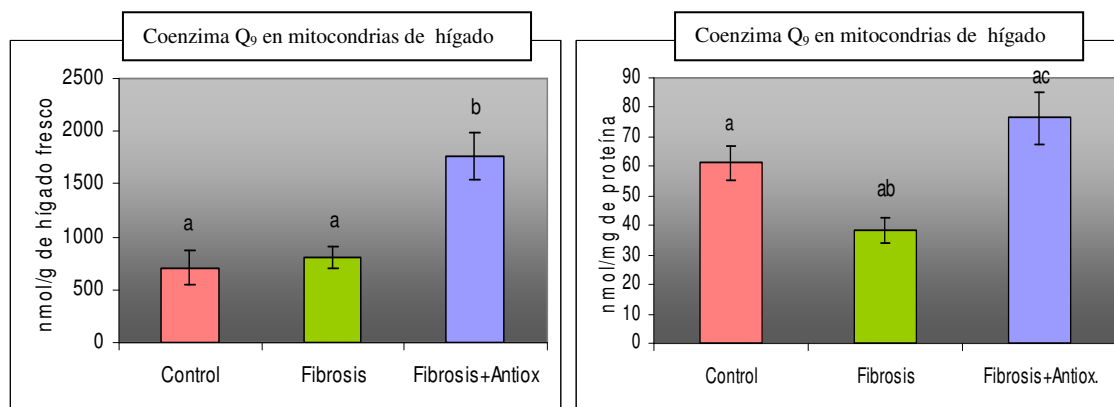


Figura 11.- Coenzima Q<sub>9</sub> en mitocondrias de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.5.- COENZIMA Q<sub>10</sub>.

Al analizar los valores encontrados de coenzima Q<sub>10</sub>, tanto en valores referidos a gramos de hígado fresco, como a miligramos de proteína, se observan los siguientes resultados.

En valores referidos a gramos de hígado fresco, aparecieron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control ( $104,63 \pm 24,70$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $186,05 \pm 13,83$ ), así como cuando se comparó el grupo fibrosis ( $93,62 \pm 16,84$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante (tabla 3; anexo). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis (figura 12).

En resultados referidos a miligramos de proteína, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $9,18 \pm 1,21$ ) con el grupo fibrosis ( $4,42 \pm 0,64$ ), así como cuando se comparó el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante ( $8,14 \pm 0,63$ ) (tabla 3; anexo). No se encontraron, en cambio, diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control y el grupo fibrosis+antioxidante (figura 12).

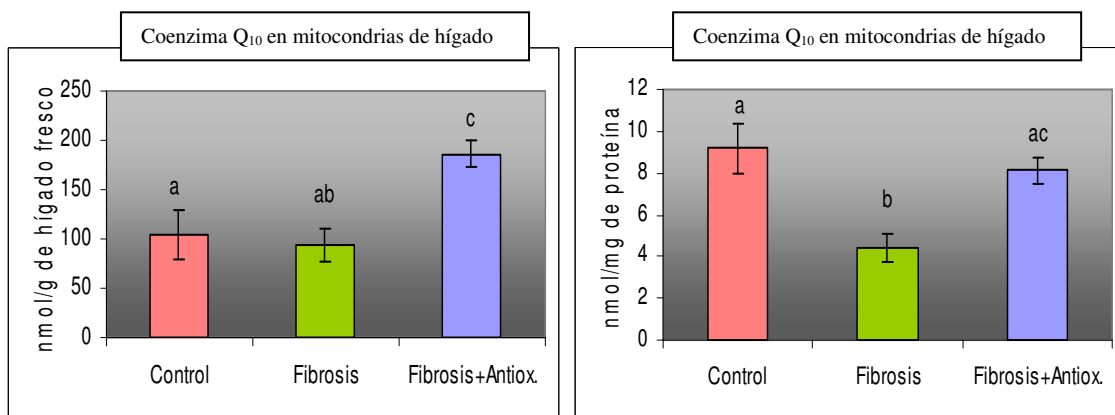


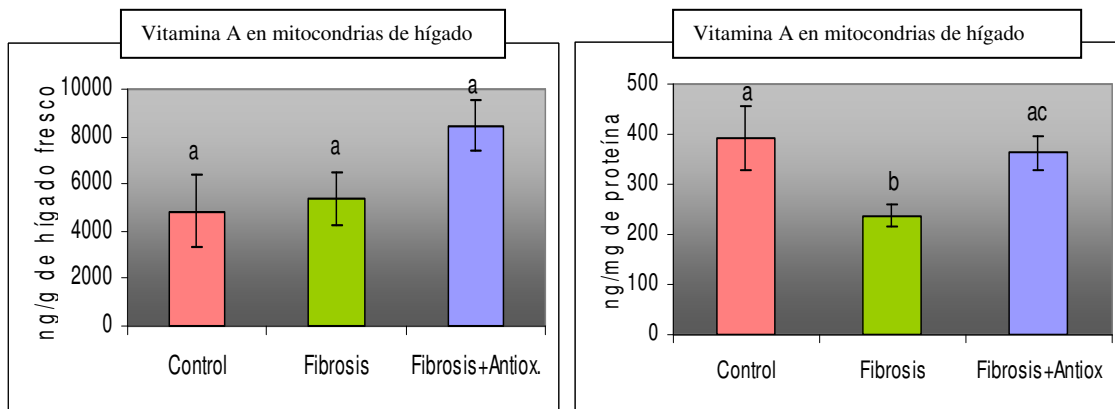
Figura 12.- Coenzima Q<sub>10</sub> en mitocondrias de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.6.- VITAMINA A.

Para valores de vitamina A referidos en gramos de hígado fresco, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Los valores para el grupo control fueron:  $4829,68 \pm 1516,71$ ; para el grupo fibrosis:  $5368,31 \pm 1076,41$ ; y para el grupo fibrosis+antioxidante fueron:  $8452,46 \pm 1040,73$  (figura 13) (tabla 3; anexo).

Cuando se analizaron los valores de vitamina A expresados en miligramos de proteína, sí se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $392,05 \pm 65,17$ ) con el grupo fibrosis ( $237,62 \pm 21,80$ ), así como cuando se comparó el grupo fibrosis

con el grupo fibrosis+antioxidante ( $363,86 \pm 33,89$ ) (tabla 3; anexo). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 13).



**Figura 13.- Vitamina A en mitocondrias de hígado.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 4.- RESULTADOS EN CITOSOL DE HÍGADO.

##### 4.1.- SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

Los valores mayores de SOD aparecieron en el grupo control ( $6,37 \pm 0,81$ ), seguidos del grupo fibrosis ( $3,67 \pm 0,59$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $1,75 \pm 0,33$ ), llegando a existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 4; anexo).

Cuando se realizó el estudio post hoc, se objetivaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el grupo control con el grupo fibrosis, el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, así como cuando se comparó el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 14).

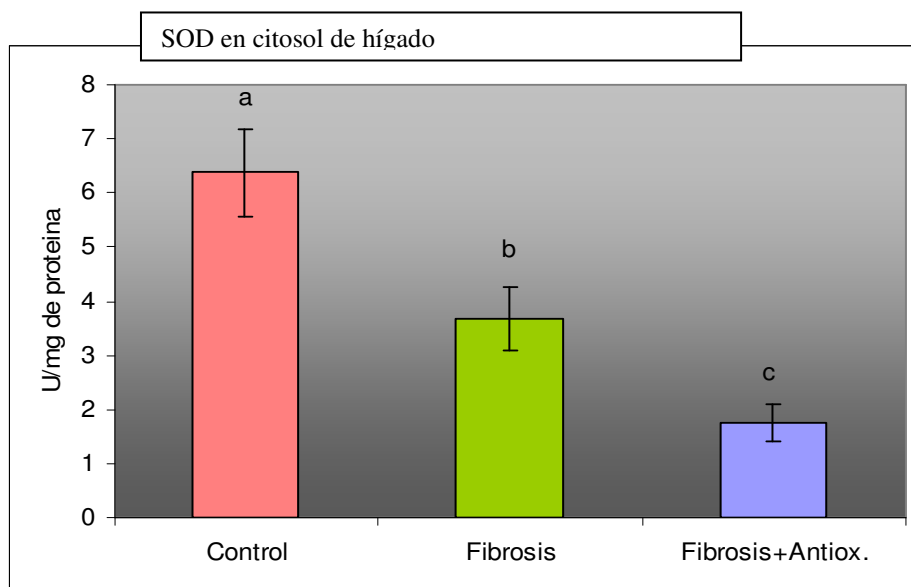
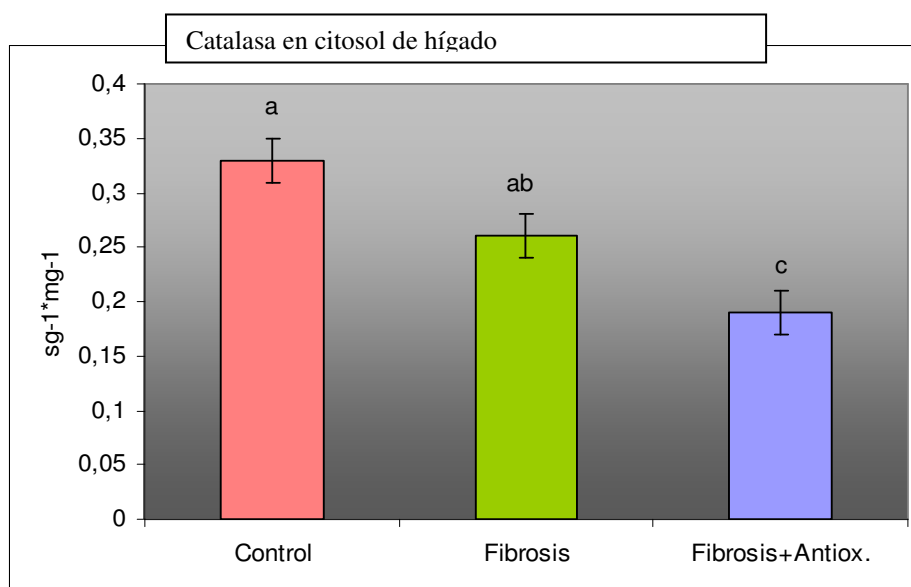


Figura 14.- SOD en citosol de hígado. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.- CATALASA.

Las cifras que se obtuvieron siguieron la misma tendencia que el parámetro anterior, siendo los valores mayores en el grupo control ( $0,33 \pm 0,02$ ), seguidos del grupo fibrosis ( $0,26 \pm 0,02$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $0,19 \pm 0,02$ ), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 4; anexo).

Cuando se analizó el estudio post hoc, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, así como cuando se comparó el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante. No llegaron a existir diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control y el grupo fibrosis (figura 15).

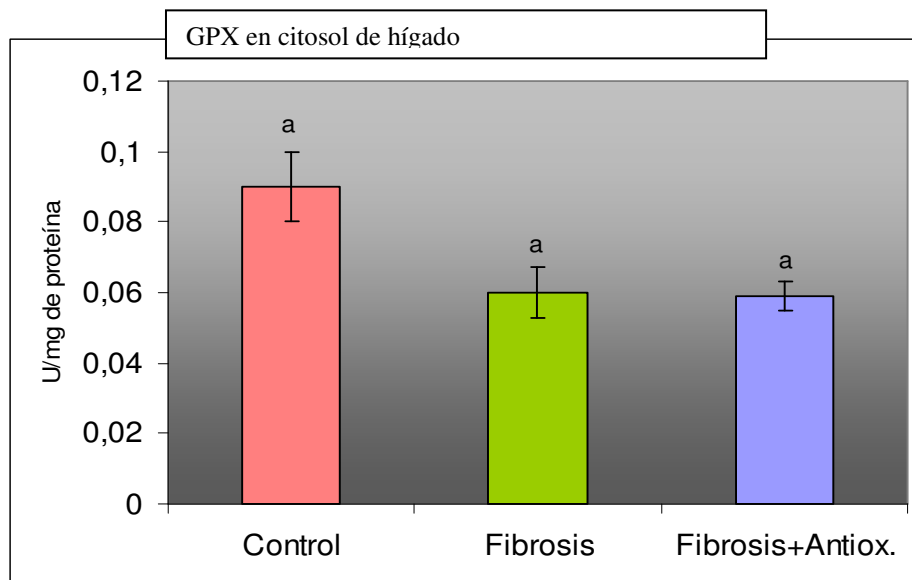


**Figura 15.- Catalasa en citosol de hígado.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.- GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).

Los valores mayores se obtuvieron en el grupo control ( $0,09 \pm 0,01$ ), siendo muy similares en el grupo fibrosis ( $0,06 \pm 0,007$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante ( $0,059 \pm 0,004$ ) (tabla 4; anexo).

El análisis estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (figura 16).



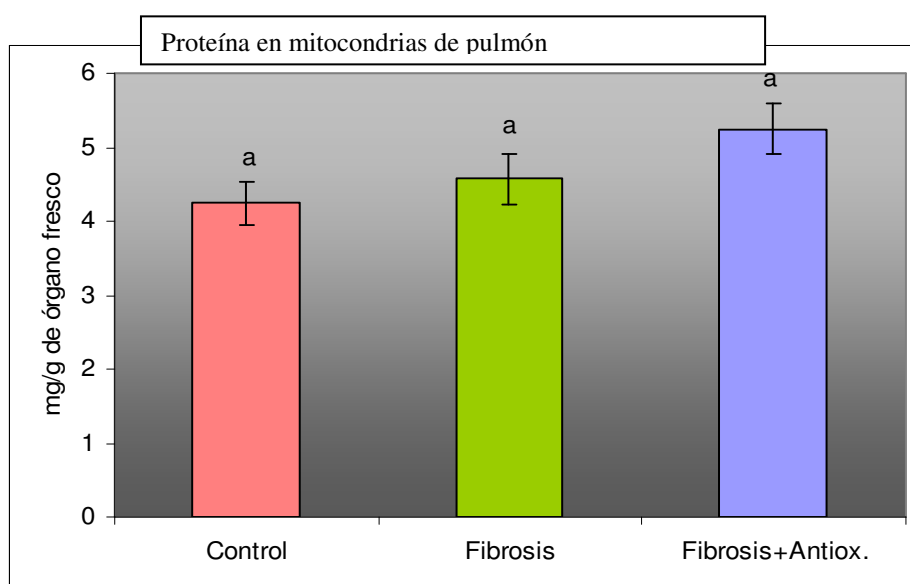
**Figura 16.- GPX en citosol de hígado.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



## 5.- RESULTADOS EN MITOCONDRIAS DE PULMÓN.

### 5.1.- PROTEÍNA.

No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de proteína (miligramos) por gramos de pulmón fresco, en el grupo control ( $4,25 \pm 0,29$ ), grupo fibrosis ( $4,57 \pm 0,34$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $5,25 \pm 0,35$ ) (figura 17) (tabla 5; anexo).



*Figura 17.- Proteína en mitocondrias de pulmón. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).*

### 5.2.- TBARS.

El estudio realizado comparando los niveles de TBARS encontrados en los distintos grupos reveló los siguientes resultados.

Para resultados expresados por gramos de pulmón fresco, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos,

siendo los valores para el grupo control ( $113,80 \pm 14,20$ ), muy similares a los del grupo fibrosis ( $100,14 \pm 8,49$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante ( $114,99 \pm 6,20$ ) (figura 18) (tabla 5; anexo).

Al expresar los resultados por miligramos de proteína, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo los valores para el grupo control ( $13,27 \pm 1,53$ ), ligeramente superiores a los del grupo fibrosis ( $10,67 \pm 0,82$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante ( $10,22 \pm 0,35$ ) (figura 18) (tabla 5; anexo).

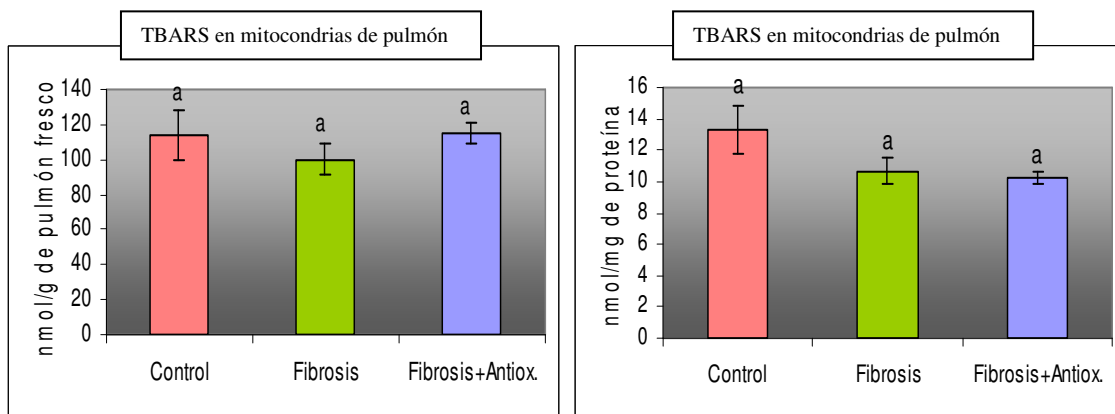


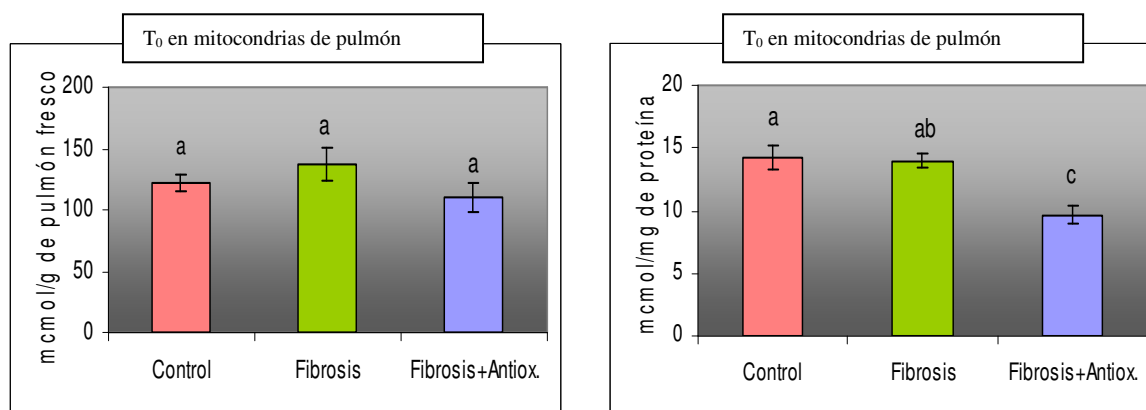
Figura 18.- TBARS en mitocondrias de pulmón. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 5.3.- HIDROPERÓXIDOS BASALES ( $T_0$ ).

Cuando se expresaron los resultados por gramos de pulmón fresco, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Los niveles detectados para el grupo control fueron:  $121,89 \pm 7,16$ ; para el grupo fibrosis:  $137,42 \pm 13,80$ ; y para el grupo fibrosis+antioxidante:  $110 \pm 11,26$  (figura 19) (tabla 5; anexo).

Si se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de  $T_0$  detectados por miligramos de proteína, en

el grupo control ( $14,28 \pm 0,98$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante ( $9,68 \pm 0,79$ ), así como el grupo fibrosis ( $13,99 \pm 0,52$ ) y el grupo fibrosis+antioxidante. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis (figura 19) (tabla 5; anexo).



**Figura 19.- T<sub>0</sub> en mitocondrias de pulmón.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 5.4.- COENZIMA Q<sub>9</sub>.

El estudio realizado comparando los niveles de coenzima Q<sub>9</sub> encontrados en los distintos grupos reveló los siguientes resultados.

Al expresar los resultados de coenzima Q<sub>9</sub> referidos a gramos de pulmón fresco, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis ( $231,66 \pm 43,11$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $563,74 \pm 97,79$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $355,13 \pm 27,20$ ) con los otros dos grupos (figura 20) (tabla 5; anexo).

Análogamente, en valores referidos a miligramos de proteína, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis ( $22,10 \pm 3,26$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $51,02 \pm 9,12$ ).

Al comparar estos dos grupos con el grupo control ( $41,40 \pm 3,04$ ), no se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 20) (tabla 5; anexo).

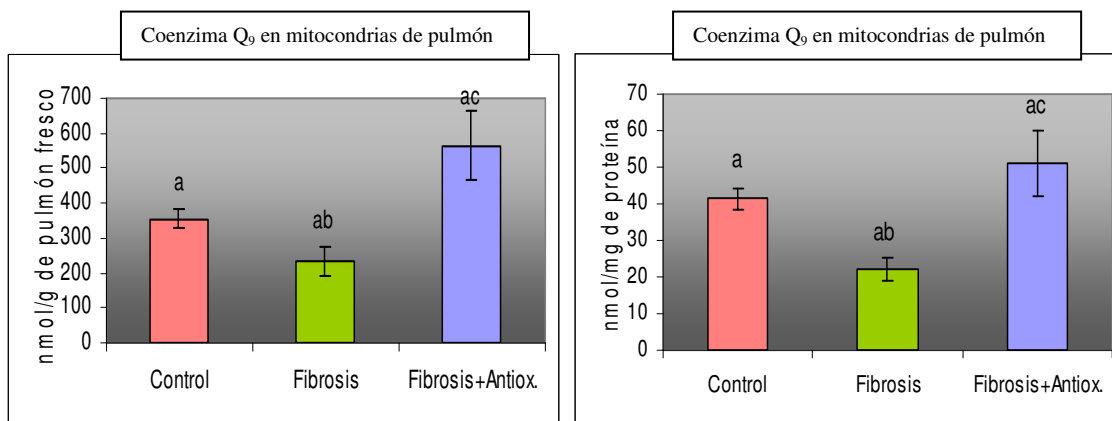


Figura 20.- Coenzima Q<sub>9</sub> en mitocondrias de pulmón. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

### 5.5.- COENZIMA Q<sub>10</sub>.

Cuando se expresaron los niveles de coenzima Q<sub>10</sub> tanto en valores referidos a gramos de pulmón fresco, como a miligramos de proteína, se objetivaron los siguientes resultados.

En valores referidos a gramos de pulmón fresco, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis ( $28,37 \pm 5,56$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $58,90 \pm 8,75$ ). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $36,43 \pm 5,39$ ) con los otros dos grupos del estudio (figura 21) (tabla 5; anexo).

Igualmente, en resultados referidos a miligramos de proteína, aparecieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis ( $2,73 \pm 0,54$ ) con el grupo fibrosis+antioxidante ( $5,31 \pm 0,77$ ).

Como ocurrió con resultados referidos a gramos de pulmón fresco, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $4,19 \pm 0,52$ ) con los otros dos grupos del estudio (figura 21) (tabla 5; anexo).

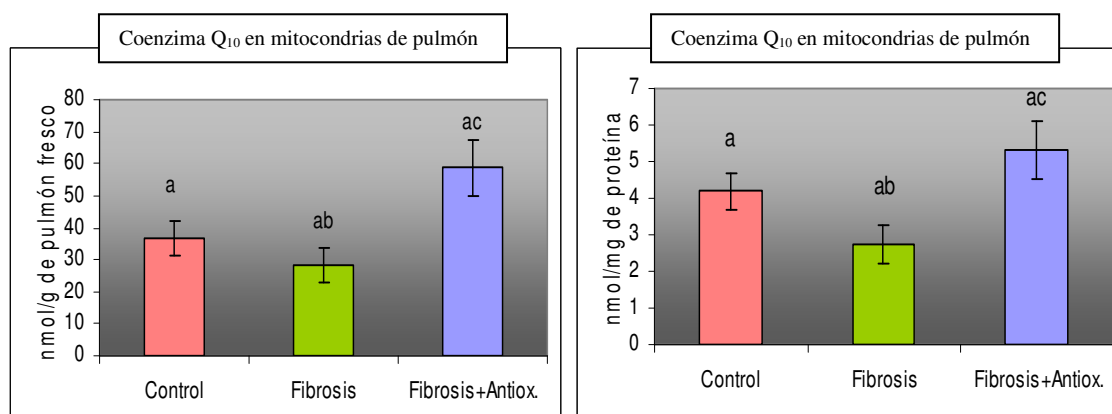


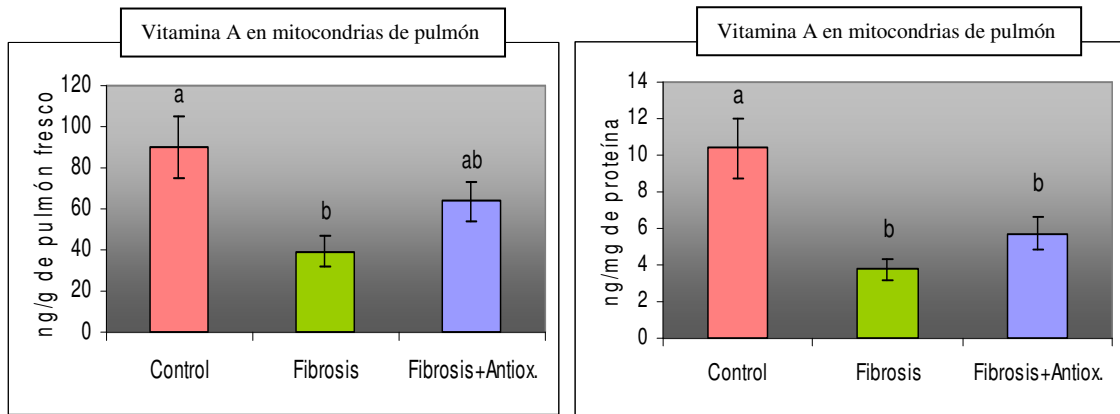
Figura 21.- Coenzima Q<sub>10</sub> en mitocondrias de pulmón. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no son coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 5.6.- VITAMINA A.

Al analizar los niveles de vitamina A referidos a gramos de pulmón fresco, se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control ( $89,94 \pm 14,92$ ) con el grupo fibrosis ( $39,14 \pm 7,55$ ). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis+antioxidante ( $63,58 \pm 9,40$ ) con los otros dos grupos del estudio (figura 22) (tabla 5; anexo).

Cuando se analizaron niveles de vitamina A expresados en miligramos de proteína, las diferencias estadísticamente significativas aparecieron al comparar el grupo control ( $10,37 \pm 1,62$ ) con el grupo fibrosis ( $3,75 \pm 0,61$ ), así como al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante ( $5,69 \pm 0,90$ ). No se objetivaron diferencias

estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante (figura 22) (tabla 5; anexo).



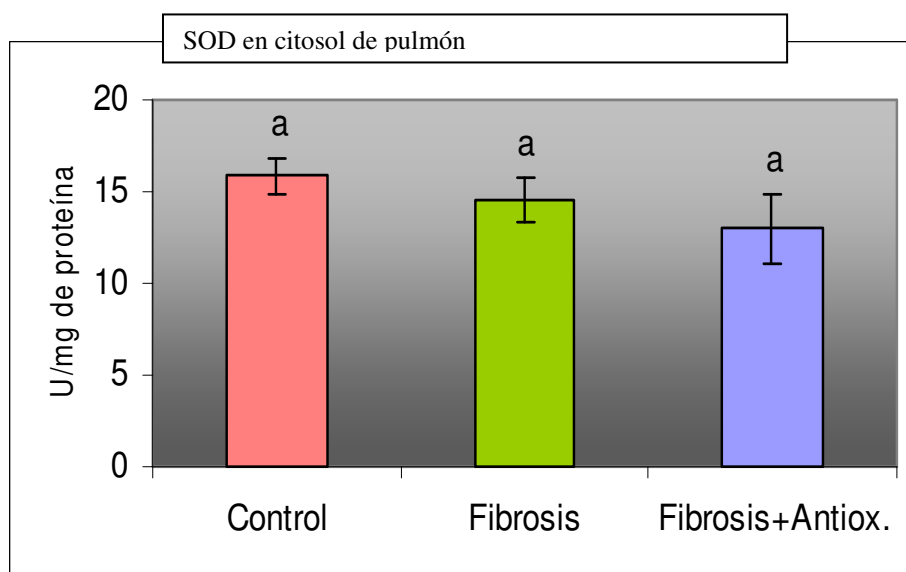
**Figura 22.- Vitamina A en mitocondrias de pulmón.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 6.- RESULTADOS EN CITOSOL DE PULMÓN.

### 6.1.- SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).

Al analizar los niveles de SOD entre los tres grupos se observaron los siguientes resultados.

Los valores mayores se encontraron en el grupo control ( $15,90 \pm 0,99$ ), seguidos del grupo fibrosis ( $14,51 \pm 1,22$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $12,98 \pm 1,89$ ). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (figura 23) (tabla 6; anexo).



**Figura 23.- SOD en mitocondrias de pulmón.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no son coincidentes presentan diferentes estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 6.2.- CATALASA.

Al igual que en el parámetro anteriormente analizado, al comparar los niveles de catalasa encontrados en los tres grupos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control ( $1,24 \pm 0,22$ ), fibrosis ( $0,73 \pm 0,13$ ) y fibrosis+antioxidante ( $0,71 \pm 0,10$ ) (figura 24) (tabla 6; anexo).

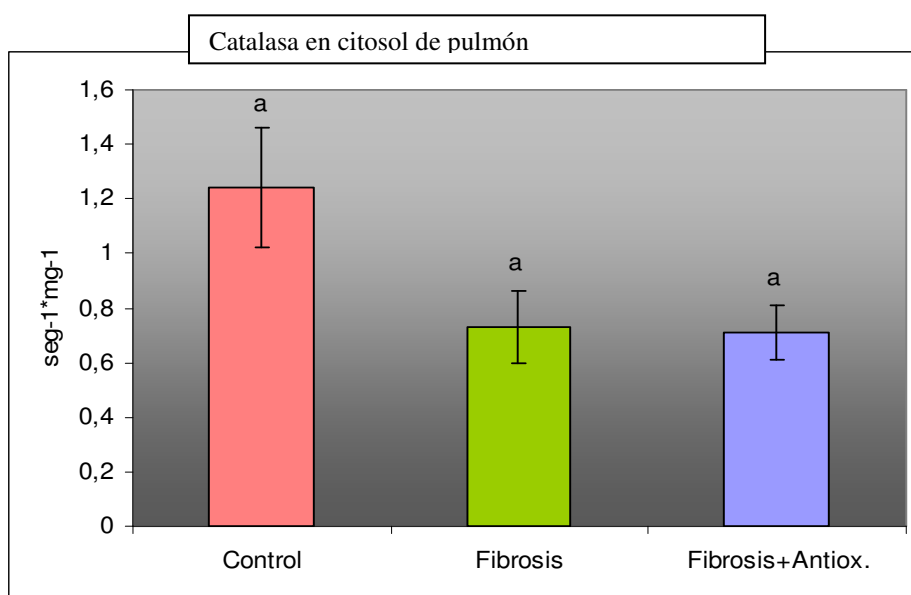


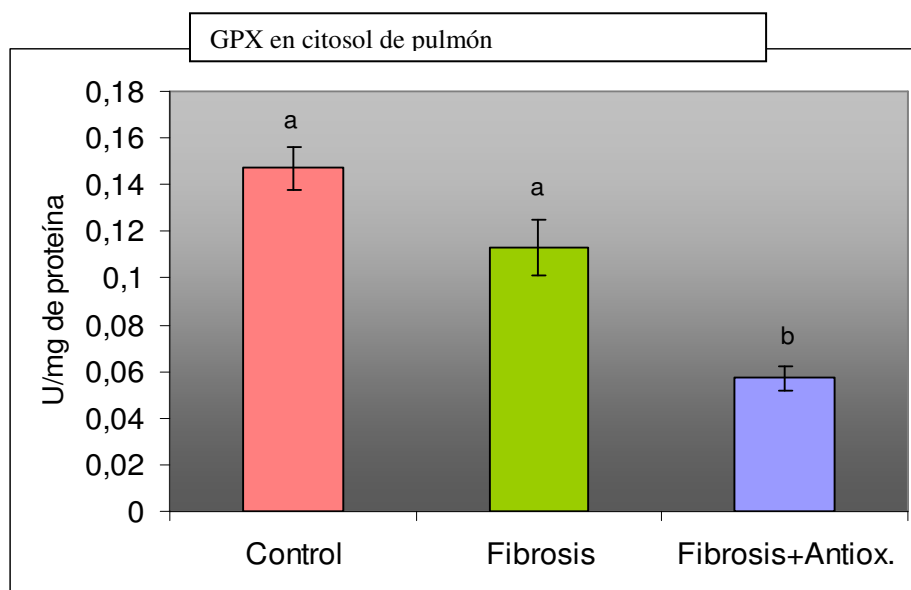
Figura 24.- Catalasa en mitocondrias de pulmón. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## 6.3.- GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).

Siguiendo la misma tendencia de los dos parámetros anteriores, los niveles de GPX encontrados fueron mayores en el grupo control ( $0,147 \pm 0,009$ ), seguidos del grupo fibrosis ( $0,113 \pm 0,012$ ) y grupo fibrosis+antioxidante ( $0,057 \pm 0,005$ ), llegando a existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 6; anexo).



El análisis estadístico post hoc reveló diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, así como al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control y el grupo fibrosis (figura 25).



**Figura 25.- GPX en mitocondrias de pulmón.** Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Para cada parámetro, las barras que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

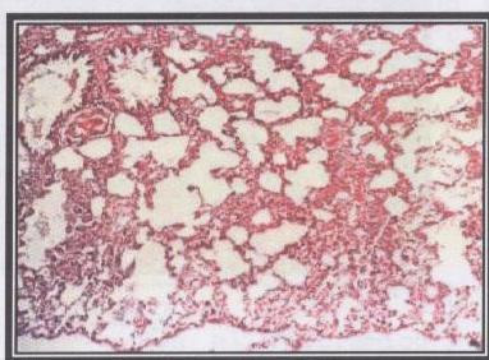
## **7.- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.**

En los animales sometidos a inhalación de talco, se encontraron diferencias morfológicas con el grupo control.

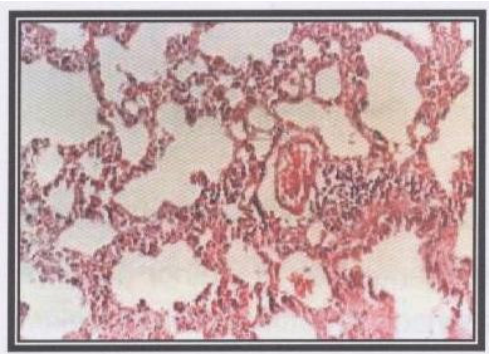
Puede observarse, con las técnicas habituales, como los tabiques interalveolares se encuentran en su mayor parte dislacerados y rotos, infiltrados por una marcada reacción inflamatoria crónica de linfocitos y células plasmáticas (figuras 26 y 27). De igual forma, existen grandes áreas de fibrosis y engrosamientos septales (figura 28).

En los cortes semifinos, además del mencionado engrosamiento y ruptura de los septos interalveolares, se observa como en el seno de los mismos, alternando con macrófagos, existe una marcada hiperplasia de Neumocitos tipo II, que se encuentran cargados de granulaciones citoplasmáticas de aspecto claro-lipídico y que forman parte del recubrimiento de la luz alveolar, en alternancia con células claras (figuras 29 y 30).

La compresión producida por el engrosamiento septal reduce de forma importante el espacio aéreo.

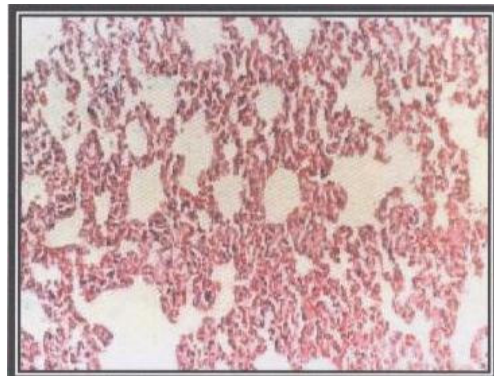


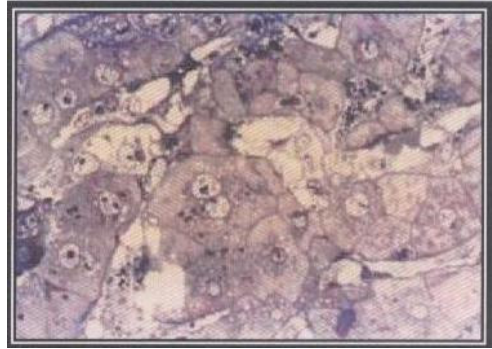
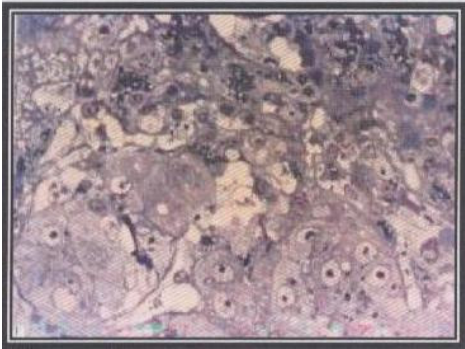
*Figura 26.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Marcada desestructuración del parénquima, con lesiones de tipo enfisema, atelectasia y fibrosis, así como infiltración y engrosamiento septal manifiesto.*



*Figura 27.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. A mayor aumento las lesiones antes mencionadas.*

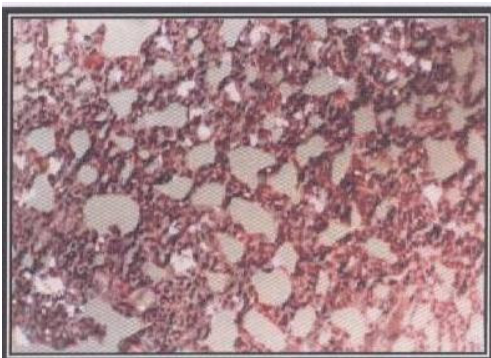
*Figura 28.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Engrosamiento septal por infiltración y fibrosis que reduce la luz alveolar.*





*Figuras 29 y 30.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Obsérvese el marcado incremento de los neumocitos tipo II, cargadas de material claro-lipídicos en su interior.*

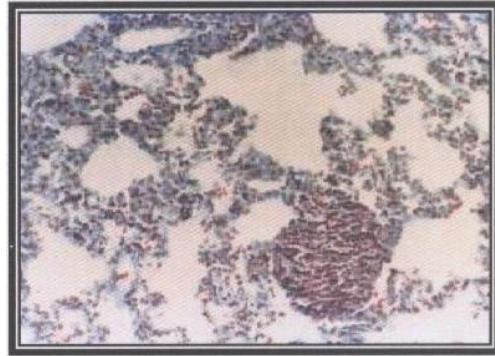
La observación de los cortes con luz polarizada, pone de manifiesto la existencia de partículas de talco (birrefringentes) en la luz alveolar (figura 31).



*Figura 31.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Además de las lesiones antes mencionadas se observa una gran cantidad de partículas de talco en el interior de los alveolos.*

La observación con la tinción Tricrómica de Granard pone de manifiesto un gran incremento del tejido conectivo (figura 32).

*Figura 32.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Con el Tricrómico de Granard se observa el tejido conectivo aumentado de tamaño, en color azul.*



En resumen podemos decir que en las lesiones histológicas observadas existe marcada atelectasia, enfisema y fibrosis, con importante infiltración inflamatoria perivascular y parenquimatosa, así como importante hiperplasia de neumocitos tipo II.



## **DISCUSIÓN**





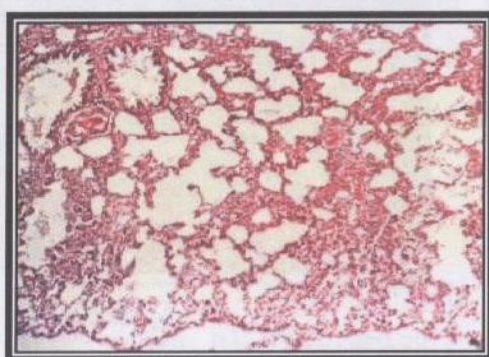
La fibrosis pulmonar, inducida experimentalmente, supone un acontecimiento estresante, desde el punto de vista fisiológico, para las ratas expuestas, con modificaciones bioquímicas y biofísicas, como quedó de manifiesto en apartados anteriores.

El estudio se planteó como un ensayo en el que se definieron tres grupos de animales, uno basal que sirviera de control y otros dos grupos sometidos a una situación de insuficiencia respiratoria crónica agudizada, provocada por el modelo de talcosis experimental propuesto por Hernández-Quero J (1980) y posteriormente por Miras Parra FJ (1981), en el que se consiguieron dos grupos homogéneos de ratas que desarrollaron insuficiencia respiratoria. La única diferencia que existió entre los dos grupos sometidos a talcosis fue, como ha quedado de manifiesto en el capítulo de material y métodos, que a un grupo se le suplementó con vitamina E (grupo fibrosis+antioxidante), mientras que al otro grupo no se le dio tal suplemento (grupo fibrosis).

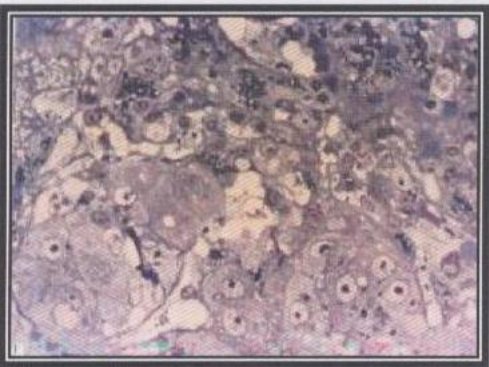
Dado el tipo de animales de experimentación y su manejo, se decidió realizar el total de las determinaciones del estudio al final del proceso de talcosis, no obteniéndose controles intermedios.

La anatomía patológica de las ratas sometidas a talcosis, desde el punto de vista morfológico, coincidió con la previamente descrita: inflamación, hiperplasia del epitelio alveolar y fibrosis septal y partículas birrefringentes en intersticio bronquial y peribronquial con focos en los que estaban incluidos células gigantes multinucleadas (*Vallyathan NV et al., 1981; Selman M et al., 2001; Mossman BT, 2000; Donaldson K, 2000*). En nuestro caso encontramos además, una marcada hiperplasia de los

Neumocitos tipo II y un evidente engrosamiento septal que reduce de forma importante el espacio aéreo (figuras 1 y 2).



*Figura 1.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Marcada desestructuración del parénquima, con lesiones de tipo enfisema, atelectasia y fibrosis, así como infiltración y engrosamiento septal manifiesto.*



*Figura 2.- Corte anatomopatológico de pulmón de rata sometida a fibrosis. Marcado incremento de los Neumocitos tipo II, cargadas de material claro-lipídico en su interior.*

Como se expuso en el capítulo de resultados, tanto en el grupo de ratas al que se le provocó una fibrosis, como en el grupo al que se le provocó una fibrosis más suplementación de antioxidante, se produjo un descenso del peso de los órganos, provocado probablemente por una disminución en el número de células de estos órganos, como consecuencia del daño que la oxidación en este modelo experimental produce. Este descenso es estadísticamente significativo cuando se compararon estos dos grupos con el grupo control, en lo que a peso de hígado se refiere.

Sun F et al. (2000) en su diseño experimental, establecieron dos grupos de ratas; un grupo control y un grupo al que administró tiocetamida con objeto de provocar una necrosis celular en el hígado. Como principal conclusión encontró que dicha sustancia provocaba un estrés oxidativo, como lo demuestra el hecho de un aumento de TBARS y de hidroperóxidos en los tejidos estudiados (hígado y plasma) y que este estrés provocaba apoptosis y necrosis celular. Abundando en esta línea de investigación, si bien analizando otros parámetros afectados por el estrés oxidativo (DNA, despolarización de membrana mitocondrial, afectación de moléculas como p-53, INF-gamma y afectación génica entre otros), no valorados en este estudio, se encuentran los trabajos realizados por Haddad JJ (2004), Sundar SV et al. (2005), Moon Y et al. (2005) y Zhang Y et al. (2005) en los que se demostró como el estrés oxidativo provoca apoptosis y necrosis celular.

Estas observaciones refuerzan la hipótesis planteada en nuestro estudio para explicar la disminución del peso de los órganos de los grupos de ratas sometidos a fibrosis (grupo fibrosis y grupo fibrosis+antioxidante), y por tanto sometidas a estrés oxidativo. Como se expuso, dicho descenso del peso era probablemente debido a un mecanismo de apoptosis y/o necrosis celular.

El modelo de fibrosis pulmonar es válido puesto que genera estrés oxidativo y repercute sobre los órganos estudiados con pérdida de masa celular. Este hecho provoca que, en dicho estrés oxidativo inducido por la fibrosis, no existan variables de referencia estables para expresar los resultados, puesto que:

a) La determinación de proteína en mitocondrias de hígado y de pulmón, varió significativamente al comparar los grupos fibrosis y fibrosis+antioxidante con el grupo control, debido al aumento de la síntesis proteica motivada por el estrés en los dos grupos expuestos.

Van Hoozen BE et al. (2000) demostraron mediante estudio experimental con ratas sometidas a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, como se produjo un aumento del tejido colágeno y de la síntesis proteica en el grupo de ratas con fibrosis pulmonar, al compararlas con el grupo control. Análogamente, Warshamana GS et al. (2001) estudiaron como una de las principales causas de la génesis de la fibrosis pulmonar en ratones, el aumento de los denominados factores de crecimiento que provocaban entre otros efectos, un aumento de la síntesis proteica en las células del epitelio pulmonar.

Estos estudios experimentales refuerzan la hipótesis planteada en nuestro estudio que versa sobre un aumento de la síntesis proteica en ratas sometidas a estrés (fibrosis pulmonar por inhalación de talco).

b) El peso del órgano, aunque varía, es más estable que la síntesis proteica. Por esta razón, utilizaremos esta variable como referencia para discutir nuestros resultados.

Conviene destacar también, que en el pulmón se produce una menor oxidación-antioxidación que en el hígado, entre otras cosas, porque en el hígado se produce una mayor metabolización y por consiguiente una mayor exposición al daño oxidativo, que en el caso del pulmón.

## **1.- CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO.**

El modelo experimental induce un estrés oxidativo, como lo demuestra el aumento de hidroperóxidos ( $T_0$ ) y TBARS en membranas mitocondriales de hígado y pulmón, y plasma (TBARS).

De entre las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), es el malondialdehído quien toma un papel preponderante en la fibrosis pulmonar.

En nuestro estudio, las determinaciones plasmáticas de TBARS fueron mayores en el grupo fibrosis que en el grupo fibrosis+antioxidante, aunque sin llegar a alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

Rahman I et al. (1999) estudiaron el estrés oxidativo a nivel pulmonar y sistémico en la fibrosis pulmonar idiopática. Para dicho objetivo midieron en plasma y lavado broncoalveolar parámetros relacionados con el balance oxidación/antioxidación, entre los que destacan los TBARS. Los pacientes incluidos en el estudio fueron divididos en tres grupos según el origen de la muestra: en el plasma de 12 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (5 fumadores); en lavado broncoalveolar de 24 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (7 fumadores) y 31 sujetos sanos (8 fumadores). Los niveles de los productos de la peroxidación lipídica en plasma y lavado broncoalveolar, medidos como TBARS, fueron significativamente mayores en fumadores y no fumadores con fibrosis pulmonar idiopática, comparados con el grupo de los sanos. A raíz de estos resultados obtuvo como conclusión principal la existencia de una alteración en el cociente entre oxidantes/antioxidantes en los pacientes con fibrosis

pulmonar idiopática, tanto a nivel pulmonar como sistémico. Recientemente, Yildirim Z et al. (2005), mediante estudio experimental con ratas, estudiaron los efectos de dos antioxidantes (N-acetilcisteína y erdosteína) sobre la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Una de las conclusiones que obtuvieron fue un descenso de los niveles de malondialdehído en el grupo de ratas al que se les suministró dichos antioxidantes. En esta misma línea de investigación se encuentran numerosos trabajos de investigación en ratas, en los que se provocó una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, que demostraron los descensos de malondialdehído al dar sustancias que se comportaban como antioxidantes (erdosteína, feital, aminoguanidina) (*Sogut S et al., 2004; Yildirim Z et al., 2004; Gong LK et al., 2005*).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio ya que como quedó expuesto en el capítulo de resultados, en nuestro grupo de ratas a las que se provocó una fibrosis sin suplementos de vitamina E, los niveles de TBARS fueron mayores que en el grupo que se provocó una fibrosis, pero con suplementación de vitamina E.

Como se pudo comprobar en el capítulo de resultados, el estrés oxidativo es ligeramente superior en mitocondrias de hígado que en mitocondrias de pulmón en lo referente a la medición de hidropéroxidos ( $T_0$ ) y se duplican los niveles de estrés oxidativo en mitocondrias de pulmón cuando utilizamos como instrumento de medida el malondialdehído. Esto puede ser debido a que el malondialdehído sea eliminado con mayor eficacia y rapidez en el hígado que en el pulmón (*Esterbauer H, 1993*).

## **2.- ESTADO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES.**

Como quedó expuesto en el capítulo de material y métodos, a las ratas pertenecientes al grupo fibrosis+antioxidantes se les administró suplementos con tocoferol. En dicho grupo se observó un aumento de los niveles de antioxidantes (vitamina E, coenzimas Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub> y vitamina A), tanto en el plasma, como en membranas mitocondriales de hígado y pulmón. Esto supone un claro aumento en la defensa de membranas frente al estrés oxidativo.

Al analizar en nuestro estudio los valores de **coenzima Q<sub>9</sub>** en plasma se objetivaron niveles significativamente mayores en el grupo fibrosis+antioxidante que en el grupo fibrosis y grupo control. Si lo que estudiábamos eran los niveles de coenzima Q<sub>9</sub> en mitocondrias de hígado y de pulmón, los resultados obtenidos siguieron la misma tendencia que en plasma, encontrándose los mayores valores en el grupo fibrosis+antioxidante, y observándose diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis+antioxidante con el grupo fibrosis.

La determinación de **coenzima Q<sub>10</sub>** se realizó en mitocondrias de hígado y pulmón observándose, como ocurría con el coenzima Q<sub>9</sub>, los mayores valores en el grupo fibrosis+antioxidante; existiendo diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante y el grupo control con el grupo fibrosis+antioxidante, en el caso de valores referidos a mitocondrias hígado; y al comparar el

grupo fibrosis con el grupo fibrosis+antioxidante en valores referidos a mitocondrias de pulmón.

Además de su papel como transportador electrónico, el coenzima Q tiene un importante protagonismo como antioxidante de membrana. Este último que ha ido ganando importancia en los últimos años, como lo demuestran los diferentes estudios realizados “in vivo” e “in vitro” en muy diferentes orgánulos celulares, tales como en vesículas de fosfolípidos, membranas reconstituidas, partículas submitocondriales, mitocondrias, microsomas, lisosomas, células intactas, así como también observaciones a nivel clínico (*Beyer RE, 1990; Littarru GP, 1994; Nohl H et al., 2001*).

Hodgson JM et al. (2003) demostraron, mediante estudio experimental con ratas, como el efecto antioxidante del coenzima Q sobre el elevado estrés oxidativo que acontece en enfermedades como la diabetes y la hipertensión arterial, mejoraba sustancialmente la disfunción vascular y mejoraba la hipertensión arterial. El mecanismo explicito por el que se produjo este hecho parece ser un efecto directo del coenzima Q sobre los marcadores de oxidación en la pared arterial.

Mukai K et al. (1993) estudiaron el efecto de varios antioxidantes (coenzimas Q, vitamina K y tocoferol) en distintas soluciones (etanol, dietil eter, benceno y n-hexano), como modelo de reacción de las distintas ubiquinonas (coenzimas Q) con radicales libres (LOO., LO. Y HO.) en los sistemas biológicos. Como principal conclusión obtuvieron que el mecanismo antioxidante más utilizado o significativo es el mantenimiento del pool de vitamina E a través de la reducción del radical  $\alpha$ -tocoferoxilo. En consonancia con este hallazgo se encuentra el estudio experimental realizado en ratas por Lakomkin VL et al. (2005), en el cual se estableció



que el coenzima Q podría incrementar la resistencia del miocardio al estrés oxidativo, no sólo por un mecanismo antioxidante directo, sino también indirectamente aumentando la protección de las enzimas antioxidantes.

En nuestro estudio, los niveles de coenzima Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub> observados, fueron siempre mayores en el grupo fibrosis+antioxidante, que en el grupo fibrosis, llegando a existir diferencias estadísticamente significativas, como ha quedado expuesto anteriormente, en plasma, mitocondrias de hígado y de pulmón. Esto, podría explicarse por el hecho de que al dar suplementos de vitamina E en el grupo fibrosis+antioxidante, se va a utilizar como antioxidante dicha vitamina E, no siendo necesario tener que regenerar la vitamina E oxidada y, por lo tanto, aumentan las concentraciones de coenzima Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub>.

Otra posible hipótesis que podría explicar el aumento de coenzima Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub> en el grupo fibrosis+antioxidante, sería que en el grupo fibrosis dicho coenzima Q actúa también como antioxidante por otras vías distintas a la de la reducción de la vitamina E. Esta función obviamente será menor en el grupo fibrosis+antioxidante, donde se le ha suplementado con vitamina E.

En relación a la **vitamina A** se detectaron niveles superiores en el grupo fibrosis+antioxidante que en el grupo fibrosis, tanto si los valores eran referidos a plasma como a mitocondrias de hígado o pulmón. Sin embargo no se llegó a alcanzar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Numerosos estudios han demostrado que los carotenoides son capaces de limitar el daño oxidativo inducido por sistemas que generan oxi-

radicales, tanto a nivel molecular como lipídico. Los beta-carotenos pueden reducir la magnitud del daño celular inducido por la xantino-oxidasa / hipoxantina o por los leucocitos polimorfonucleares activados (*Weitberg AB et al., 1995*), así como inhibir la peroxidación lipídica inducida por fuentes enzimáticas de oxi-radicales, como el sistema xantino-oxidasa (*Kellog EW et al., 1975*), y el NADPH / citocromo P-450 reductasa (*Dixit R et al., 1983; Kim H, 1990*), o por fuentes no enzimáticas como las sales de metales de transición (*Searle AJF et al., 1983; Polyakov NE et al., 2001*).

La mayor parte de estos estudios han sido realizados “in vitro”, aunque los estudios realizados “in vivo” refuerzan los datos obtenidos, destacando aspectos importantes en la actividad antioxidante de los carotenoides; como es la eficiencia en una disminución directa de la peroxidación lipídica o la habilidad de esta molécula para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes (*Krinsky NI, 1993; Krinsky NI, 2001; Stahl W et al., 2003*).

Palozza P et al. (1992) demostraron que el mecanismo de acción de los  $\beta$ -carotenos en la inhibición de la peroxidación lipídica consiste esencialmente en transformar el radical  $\alpha$ -tocoferoxilo en  $\alpha$ -tocoferol, regenerando de este modo el potencial antioxidante de la vitamina E. En la misma línea de investigación se encuentran los trabajos realizados por Niki E et al. (1995) y Zhang P et al. (2000) en los que se comprobó la interacción existente entre vitamina C, vitamina E y  $\beta$ -caroteno sobre la peroxidación lipídica.

Los niveles de vitamina A en nuestro estudio, siempre fueron mayores en el grupo fibrosis+antioxidante que en el grupo fibrosis, para

valores referidos a plasma, mitocondrias de hígado, o mitocondrias de pulmón. Este hallazgo está en relación a que en el grupo fibrosis+antioxidante, al dar suplementos de vitamina E, esta última actuaría como “antioxidante principal” y por tanto sería menos necesario emplear otros sistemas antioxidantes. Por el contrario, el hecho de que los niveles de vitamina A estuvieran más bajos en el grupo fibrosis se podría explicar por no haber suplementación en la dieta con vitamina E y estar sometido al mismo estrés oxidativo que el grupo fibrosis+antioxidante. Por este motivo, el grupo fibrosis emplearía más vitamina A como antioxidante y, por tanto su concentración sería menor.

El descenso de los niveles de vitamina A en el grupo fibrosis, podría estar en relación con la necesidad de reducir el radical  $\alpha$ -tocoferoxilo en  $\alpha$ -tocoferol, como se expresó anteriormente (*Palozza P et al., 1992; Niki E et al., 1995; Zhang P et al., 2000*). Esta función de la vitamina A, obviamente será menor en el grupo donde se suplementa vitamina E (grupo fibrosis+antioxidante).

En nuestro estudio, al analizar los niveles **vitamina E** detectados en plasma, se observaron niveles mayores y estadísticamente significativos, en el grupo fibrosis+antioxidante con relación a los grupos control y grupo fibrosis. Estos resultados, son esperables ya que al grupo fibrosis+antioxidante se le suministraron altas dosis de vitamina E.

Retomando el contenido del párrafo referente al aumento de niveles antioxidantes en plasma y membranas mitocondriales de hígado y pulmón en el grupo fibrosis+antioxidante y que suponía un claro aumento en la defensa de las membranas frente al estrés oxidativo, conviene destacar que esta defensa es insuficiente puesto que los niveles de malondialdehído

(TBARS) y de hidroperóxidos ( $T_0$ ) son similares en todos los grupos de estudio. Las hipótesis que se podrían barajar para explicar esto son:

a) Habría que haber dado el antioxidante, en el grupo fibrosis+antioxidante, después y no simultáneamente a la inducción de la fibrosis pulmonar.

b) Se tendría que haber dado más tiempo (sacrificio posterior de las ratas) a que el tratamiento con tocoferol hiciera efecto. Esto se evidencia porque existe una tendencia a la mejoría del estrés oxidativo, como lo demuestran los valores de hidroperóxidos, en membranas mitocondriales de hígado y pulmón.

c) Que la dosis suplementada en el grupo fibrosis+antioxidante de tocoferol, no fuera la idónea (más alta o más baja), nos parece que tiende a ser dosis alta. Esto tiene su importancia porque la mayoría de las veces, dosis altas de antioxidantes se comportan como prooxidantes.

Conviene destacar que es muy difícil definir una dosis correcta antioxidante de vitamina E. Dicha dosis varía ostensiblemente según los distintos estudios y objetivos a alcanzar en los mismos. Se consiguió un consenso entre expertos sobre los niveles de seguridad de la dosis de vitamina E en humanos, así, establecieron rangos terapéuticos hasta las 800 UI/día (*Pryor WA, 2000*). Según el vademécum internacional, la dosis terapéutica de vitamina E en humanos oscila entre 50 UI/día y 1000 UI/día, dependiendo de la patología a tratar (*Vademecum internacional, 2005*). En animales, las dosis aún son más difíciles de definir. En estos, la variabilidad depende principalmente del tipo de animal de experimentación así como, al

igual que ocurría para humanos, del objetivo que se quiera alcanzar en el estudio (*Pryor WA, 2000*).

Numerosos estudios han demostrado que altas dosis de antioxidantes, lejos de reducir el estrés oxidativo, producen efectos prooxidantes. Ikemoto M et al. (2002) estudiaron el efecto de la vitamina E sobre el catabolismo del músculo estriado. Para esto dividió a las ratas en dos grupos, grupo control y grupo al que administró 15 mg/día de  $\alpha$ -tocoferol. Como principal resultado obtuvo un aumento de los niveles de TBARS, así como descensos en los niveles de glutatión en músculo estriado en el grupo de ratas al que se había administrado 15 mg/día de vitamina E con respecto al grupo control. Este hecho les llevó a concluir que 15 mg/día de vitamina E era una dosis alta para las ratas y que, por consiguiente, actuaría como prooxidante.

Estos resultados concuerdan con los observados en nuestro estudio, y es más que previsible que la dosis de 200 UI/día de vitamina E (equivalentes aproximadamente a 200 mgr/día de vitamina E), con la que se suplementó a cada una de las ratas de nuestro grupo fibrosis+antioxidante, fueran dosis altas y, por tanto, la vitamina E se comportaría como prooxidante. Esto, justificaría en gran medida, por qué los niveles de malondialdehído y de hidroperóxidos son similares en todos los grupos de nuestro estudio.

Al igual que le ocurre a la vitamina E, y como se ha comentado anteriormente, otros antioxidantes, como los carotenoides, se comportan como prooxidantes a dosis altas (*Palozza P et al., 2003; Palozza P et al., 2005; Siems W et al., 2005*). También se pudo comprobar el mismo efecto prooxidante de la N-acetilcisteína (sustancia exógena al organismo que se

comporta como antioxidante), cuando se suministró a altas dosis sobre los ratones objeto del estudio (*De La Fuente M et al., 2002*).

En lo referente a los **sistemas enzimáticos antioxidantes** es de especial interés comprobar como la fibrosis produce un descenso de la actividad de enzimas antioxidantes, atribuible al daño celular provocado por la fibrosis en el modelo experimental y que el periodo de inducción es relativamente corto. Este hecho se ve más acentuado en el grupo fibrosis+antioxidante. La explicación a esto la podríamos encontrar, básicamente, por dos mecanismos:

a) El talco podría ser un inhibidor de síntesis de enzimas antioxidantes y/o un potente inhibidor de la actividad de dichas enzimas.

b) La disminución de la actividad de dichas enzimas se acentuaría porque existan unos niveles de antioxidantes no enzimáticos muy elevados y por tanto la inducción enzimática sería menos necesaria para la protección de las células frente a la oxidación.

Desde el punto de vista de protección enzimática frente al estrés oxidativo, es de especial mención, que el hígado esta menos protegido que el pulmón puesto que los niveles de Superóxido Dismutasa (SOD) en el grupo fibrosis+antioxidante de membranas mitocondriales de hígado están muy descendidos si se comparan con los valores homónimos de pulmón.

## **CONCLUSIONES**





1<sup>a</sup> El modelo de fibrosis pulmonar utilizado en el estudio es válido, como lo demuestran los resultados obtenidos de la anatomía patológica así como de los marcadores de estrés oxidativo.

2<sup>a</sup> Este modelo induce una pérdida de masa celular de los dos tejidos estudiados (hígado y pulmón), por inducción de los mecanismos apoptóticos y/o necróticos.

3<sup>a</sup> La dosis de tocoferol exógena utilizada reduce los niveles de estrés oxidativo, si bien, habría que ajustar la dosis en futuros trabajos de investigación, puesto que no se restablece la actividad de las enzimas antioxidantes.

4<sup>a</sup> La fibrosis pulmonar, inducida experimentalmente con talco, produce un descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes, más acentuado en el grupo suplementado con tocoferol. Este hecho podría atribuirse, principalmente, al posible efecto inhibitor del talco sobre los enzimas antioxidantes, o bien a que los elevados niveles de antioxidantes no enzimáticos produzca una menor inducción enzimática al ser menos necesaria para la protección de las células frente a la oxidación.





## **BIBLIOGRAFÍA**





## **BIBLIOGRAFÍA.**

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;150:121-7.

Álvarez-Sala L, Millán J, Oya M. La dieta mediterránea en España. ¿Leyenda o realidad? (II). Otros elementos de la dieta mediterránea: verdura y fruta, el pescado. Evolución de la dieta y las enfermedades cardiovasculares en España en las últimas décadas. *Rev Clin Espa*. 1996;196:78-88.

Álvarez-Sala R, Prados C, García FR, Lázaro TC, García-Saute JL, Pino JM, et al. Fibrosis pulmonar idiopática: nuevas perspectivas diagnósticas y terapéuticas. *An Med Intern*. 1993;10:355-60.

American Thoracic Society. ATS/ERS international consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:277-304.

Aniya Y, Naito A. Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione s-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology*. 1993;45(1):37-42.

Anuoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1991;273:601-4.

Auroma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1989;264:13024-8.

Aw TY, Anderson BS, Kennedy FG, Jones DP. Intracellular O<sub>2</sub> supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1986;134:707-16.

Babior BM. Oxygen-dependent microbial Killing by phagocytes. *N England J Med.* 1978;298:659-68.

Ballester M, Honorem V. Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque quimico-orgánico-físico. *Med Clin.* 1996;107:509-15.

Batelli MG, Dellacorte E, Stirpe F. Xantine oxidase type D (dehidrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochemistry.* 1972;126:747-9.

Battino M, Fato R, Parenti-Castelli G, Lenaz G. Coenzyme Q can control the efficiency of oxidative phosphorylation. *Int J Tissue Reactions.* 1990;12:137-44.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent Hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:1620-4.

Bellomo G, Orenius S. Altered thiol and calcium homeostasis in oxidative hepatocellular injury. *Hepatology.* 1985;5:876-82.

Benzi G, Moiretti A. Age and peroxidate stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radical Biology & Medicine.* 1995;19(1):77-101.



Bersohn MM, Philipson KD. Sodium calcium exchange and sarcolemmal enzymes in ischaemic rabbit hearts. *Am J Physiol.* 1982;242(5):C288-95.

Beyer RE. "The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation". *Free Radical Biol Med.* 1990;8:545-65.

Bielski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the activity of  $\text{HO}_2^-$  /  $\text{O}_2^-$  with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 1983;258:4759-61.

Borevis A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. *FEBS Lett.* 1975;54:311-4.

Borevis A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134:707-16.

Bowry VW, Mohr D, Clearly J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation of ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1995;270:5756-63.

Buettner GR, Jurkiewicz BA. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In: Packer L, Cadenas E, editors. *Handbook of Antioxidants.* New York: Marcel Dekker; 1995. p. 91-115.

Buhl R, Meyer A, Vogelmeier C. Oxidant-protease interaction in the lung. *Chest.* 1996;110:S267-72.

Burton GW, Joyce A, Ingoldy KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*. 1982;11:327-8.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 1985;113:484-90.

Carp H, Millar F, Oídla JR, Janoff A. Potential mechanism of emphysema: alpha-1-proteinaseinhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidised methionine and has decreased elastase inhibitory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:2041-5.

Casado JA, Merino J, Cid J, Subirá A, Sánchez-Ibarrola A. Oxidantes y radicales libres en biomedicina. *Rev Med Univ Navarra*. 1996;40(2):231-40.

Chan AC, Tran K, Raynor T, Ganz PR, Chow CK. Regeneration of vitamin E in human platelets. *J Biol Chem*. 1991;266:17290-5.

Chance B, Sies H, Borevis A. *Physiol Rev*. 1979;59:577-605.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):481-93.

Cherniak RM. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals with interstitial pulmonary fibrosis and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:S169-93.

Chow CK. Vitamine E and oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 1991;11:215-32.

Coghlan JG, Flitter WD, Ilesley CD. Reperfusion of infarcted tissue and free radicals. *Lancet.* 1991; 338(8775):1145-6.

Corongiu FP, Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Slater TF. Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. *Chemico-Biological Interactions.* 1986;59:147-55.

De Mello AC, Menegini R. Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from letal and DNA damaging effects produced by active oxygen species. *Biochem biophys acta.* 1985;847:82-9.

Dean RT, Thomas SM, Garner A. Free radical mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane. Role of lipid radicals. *Biochem J.* 1986;240:489-94.

Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Phisical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Reviews.* 1970;50(3):319-75.

DellaCorte E, Stirpe F. The regulation of at liver xanthine oxidase: involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (tipe I) into oxidase (type II) and purification of the enzyme. *Biochemistry.* 1972;126:736-45.

De La Fuente M, Miquel J, Catalan MP, Victor VM, Guayerbas N. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune

functions is higher in aged than in adult mice. *Free Radic Res.* 2002;36(2):119-26.

De Jong JW, Van de Meer P, Nieukoop AS, Huizer T, Stroeve RJ, Bos E. Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ Resp.* 1990;67:770-3.

Dieber-Rotheneder M, Phul H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H. Effect of oral supplementation with d-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res.* 1991;32:1325-32.

Dixit R, Mukhart H, Bickers DR. Studies on the role of reactive oxygen species in mediating lipid peroxidation formation in epidermal microsomes of rat skin. *J Invest Dermatol.* 1983;81:369-75.

Dizdaroglu M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell B, Auroma OI, editors. *DNA and free radicals.* London: ELLIS HORWORD; 1993. p. 19-39.

Donaldson K. Nonneoplastic lung response induced in experimental animals by exposure to poorly soluble nonfibrous particles. *Inhal Toxicol.* 2000;12(1-2):121-139.

Dreosti IE, Record IR. Superoxide dismutase (Ec 1.15.1.1), zinc status and ethanol consumption in maternal and fetal rat livers. *Br J Nutr.* 1979;41(2):399-402.

Durán N, Farias Furtado ST, Faljoni-Alario A, Campa A, Brunet JE, Freer J. Singlet oxygen generation from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of an activated CH<sub>2</sub> substrate. *J Photochem.* 1984;25:285-9.

Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J Nut Sci Vitaminol.* 1992;548:41-6.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation products. *Am J Clin Nutr.* 1993;57:S779-86.

Esterbauer H, Striegl G, Phul H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989;6:67-75.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and determination. In: Vigo-Pelfrey C, editor. *Membrane Lipid Oxidation.* Boca Raton: CRP Press; 1990. p. 239-83.

Esterbauer H, Zollner H, Schaur RJ. Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation. *Atlas Sci Biochem.* 1988;1:35-45.

Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin.* 1993;49(3):577-87.

Fleischer S, McIntyre IO, Vidal JC. Large scale preparation of rat liver mitochondria in high yield. *Methods Enzymology.* 1979;55:32.

Flitter WD. Free radical and myocardial reperfusion injury. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):545-55.

Flohe L, Wolfgang AG. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzimology*. 1984;105:114-21.

Frankel EN. Lipid-oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *JAOCS*. 1984;61(2):1908-17.

Fridovich I. In: Pryor A, editor. *Free radicals in Biology*. New York: Academic Press; 1976. p. 239.

Fridovich I. Superoxide dismutase. *Ann Rev Biochem*. 1975;44:147-59.

Fridovich I. Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 1989;264:7761-4.

Friedl HP, Smith DJ, Till GD. Ischaemia reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol*. 1990;136:491-5.

Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidants vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:1368-77.

Gillery P, Monboisse JC, Marquat FX, Borel JP. Mecanismos de viellesement des proteines. *Dibetes Metabolisme*. 1991;17:1-15.

Gong LK, Li XH, Wang H, Zhang L, Chen FP, Cai Y, et al. Effect of Feitai on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(3):537-44.

Grahan WB, Maret GT. Vitamin E : antioxidant, activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:357-82.

Grandhee SK, Monnier UM. Mechanism of formation of the maillard protein cross-link pentosidine; glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem.* 1991;266:11649-53.

Granger DN, Rutilio G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischaemia. *Gastroenterology.* 1981;81:282-91.

Green FH. Overview of Pulmonary Fibrosis. *Chest.* 2002;122:334-9.

Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 1988;23:455-63.

Griffiths HR, Lunec J. The effects oxygen free radicals on the carbohydrate moiety of IgG. *FEBS Lett.* 1989;245:95-9.

Groner Y, Elroy-Stein O, Auraham KB. Down syndrome clinical symptoms are manifested in transfected cells and transgenic mice overexpression the human Cu/Zn-superoxide dismutase gen. *J Physiol (Paris).* 1990;84:53-77.

Grootveld MC, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed joint: Detection of abnormal low molecular weight

metabolites by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem J.* 1991;273:459-67.

Groos TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2001;345:517-25.

Grum CM, Ragsdale RA, Ketai LH, Simon RH. Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J Crit Care.* 1987;2:22-6.

Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Glutathione transferase from rat testis. *Methods in enzymology.* 1985;186:448-57.

Gutteridge JMC, Paterson SK, Segal AW, Halliwell B. Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochemical Journal.* 1981;199:259-61.

Guyton KZ, Kensler TW. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin.* 1993;49(3):523-44.

Haddad JJ. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signalling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(4):475-93.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(5suppl):S715-22.

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.



Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radical in biology and medicine. 2th ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation. Oxygen radical, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*. 1984;1:1396-8.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246:501-14.

Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91:14-21.

Halliwell B. Uric acid; an example of antioxidant evaluation. In: Packer L, Cadenas E, editors. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 243-55.

Handelman GJ: Carotenoids as scavenger of active oxygen species. In: Packer L, Cadenas E, editors. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 259-313.

Hansell DM, Kerr IH. The role of high resolution computed tomography in the diagnosis of interstitial lung disease. *Thorax*. 1991;46:77-84.

Haslam PJ, Bauer W, De Rose W. The clinical role of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Dis* 1992;2:58-63.

Hay ED. Extracellular Matrix. *J Cell Biol*. 1981;91:205-12.

Herman B, Gores GJ, Nieminen AI, Kawanishi T, Harman A, Lemasters JJ. Calcium and Ph in anoxic and toxic injury. *Crit Rev Toxicol.* 1990;21:217-48.

Hernández Quero J. Alteraciones en el metabolismo pulmonar de las grasas: estudio experimental en la insuficiencia respiratoria y tras administración de cortisol [Tesis]. Universidad de Granada; 1980.

Hodgson JM, Watts GF. Can coenzyme Q10 improve vascular function and blood pressure? Potential for effective therapeutic reduction in vascular oxidative stress. *Biofactors.* 2003;18(1-4):129-36.

Homma S, Nagaoka I, Abe H, Takahashi K. Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:2084-9.

Hunnighake G, Kalica A. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit care Med.* 1995;151:915-8.

Hunnighake G, Zimmerman MB, Schwartz DA, King TE, Lynch J, Hegele R et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:193-6.

Ikemoto M, Okamura Y, Kano M, Hirasaka K, Tanaka R, Yamamoto T, et al. A relative high dose of vitamin E not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. *J Physiol Anthropol.* 2002;21(5):257-63.

Jessup W, Rankin SM, De Whalley CV, Hoult JRS, Scott JY, Leake DS.  $\alpha$ -Tocoferol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem J.* 1990;265:399-405.

Jewett SL, Eddy LJ, Hochstein P. Is the autoxidation of catecholamines involved in ischaemia-reperfusion injury?. *Free Rad Biol Med.* 1989;6:185-8.

Jiang ZY, Woolard ACS, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycolation. *FEBS Lett.* 1990;268:69-71.

Jiang ZY, Woolard ACS, Wolf SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xilenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids.* 1992;26:853-6.

Jones DP, Thor H, Smith MT. Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca sequestration during oxidative stress and its prevention by glutathione. *J Biol Chem.* 1983;258:6390-3.

Kagan VE, Serbiona EA, Koynova EA, Kitanova SA, Tyurin VA, Stoytchev TS, et al. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Rad Biol Med.* 1990;9:117-26.

Kam DW. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The Inflammation Hypotesis Revisited. *Chest.* 2003;124:1187-90.

Kanofsky JP, Sima P. Singlet oxygen production from reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem.* 1991;266:9039-42.

Kass GEN, Bellono G, Juedes MJ, Orrenius S. Toxic effects of calcium on mitochondria. *Methods Toxicol.* 1993;2:278-88.

Kellog EW, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1975;250:8812-21.

Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ.* 2004;17(2):153-60.

Kim H. Effects of oral dosing vehicles, routes and patterns of exposure on target toxicity and pharmacokinetic of carbon tetrachloride in rats. *Korean J Nutr.* 1990;23:434-43.

Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Crit Care Med.* 2003;167:1600-19.

Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis. A Possible Role for Redox Modulatory Therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:417-22.

Kirstein D. Inhaled steroids for sarcoidosis?. *Eur Respir J.* 1995;8:679-81.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity. *Immunol Today.* 1992;13:157-60.

Krinsky NI. Actions of carotenoids in biological systems. *Ann Rev Nutr.* 1993;13:561-87.

Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 2001;17(10):815-7.

Kröger A. Determination of contents and redox state of ubiquinone and menaquinone. *Methods Enzymology*. 1978;53:579-91.

Krsek JA, Webster RO. Ceruloplasmin inhibits carbonyl formation in endogenous cell proteins. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:115-9.

Kukreja RC, Konotos HA, Hess ML, Ellis FF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Cir Res*. 1986;59(6):612-9.

Lakomkin VL, Konovalova GG, Kalenicova EI, Zabbarova IV, Kaminniy AI, Tikhaze AK, et al. Changes in antioxidant status of myocardium during oxidative stress under the influence of coenzyme Q10. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(1):79-84.

Landi L, Fiorentini D, Stefanelli C, Pasquali P, Pedulli GF. Inhibition of autoxidation of egg yolk phosphatidylcholine in homogeneous solution and in liposomes by oxidized ubiquinone. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1028:223-8.

Landvik SV, Diplock AT, Packer L. Efficacy of vitamin in human health and disease. In: Packer L, Cadenas E, editors. *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 63-87.

Laurindo FRM, da Luz PL, Uint L. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation*. 1991;83:1705-15.

Lesur O, Bernard A, Arsalane K, Lauwerys R, Bégin R, Cantin A, et al. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:290-7.

Liao D, Gurtner Gh. Calcium dependence of the serine proteases involved in oxidant activation of phospholipases A2. *FASEB J*. 1993;7:346-9.

Liebler DC. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Crit Rev Toxicol*. 1993;23:147-69.

Lindhal T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *TIBS*. 1995;20:405-10.

Litarru GP. Energy and defense. Facts and perspective on coenzyme Q<sub>10</sub> in biology and medicine. Casa Editrice Scientifica Internazionale. Roma. 1994.

Litarru GP, Lippa S, Oradei A, Fiorini RM, Mazzanti L. Metabolic and diagnostic implications of human blood CoQ<sub>10</sub> levels. In: Folker K, Litarru GP, Yamagami T, editors. *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*. Amsterdam: Elsevier Science; 1991. p. 167-78.

Lois M, Brown LA, Moss IM, Roman J, Guidot DM. Ethanol ingestion increases activation of matrix metalloproteinases in rats lungs during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1354-60.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RG. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Lunec J, Brailsford S, Hewitt SD, Morris CJ, Blake DR. Free radicals: Are they possible mediators of IgG denaturation and immune complex formation in rheumatoid arthritis?. *Int J Immunotherapy.* 1986;3:39-43.

Machlin LJ. Vitamin E. In: Packer L y Cardenas E, editors. *Handbook of Antioxidants.* New York: Marcel Dekker; 1991. p. 99-144.

MacNee W, Rahman I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1995; 50 Suppl 1:S553-4.

Maiorino M, Gregolin C, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* 1990;186:448-57.

Mal H, Brugiere O, Dauriat G, Groussard O, Valeyre D, Fournier M, et al. Lung transplantation in patients with pulmonary fibrosis. *Rev Pneumo Clin.* 2005;61(3):232-8.

Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* 1985;113:491-5.

Mastruzzo C, Crimi N, Vancheri C. Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Ach Chest Dis.* 2002;57:137-6.

Mataix J, Mañas M, Quiles J, Battino M, Cassinello M, López-Frías M et al. Coenzima Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. *Molec Aspects Med.* 1997;18:S129-35.

McCord JM. Free radical and heart disease. *Bibli Nutr Dieta.* 1989;43:327-37.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry.* 1969;244(22):6049-55.

Meister A. Glutathione, Ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research.* 1994;54:S1969-75.

Mellors A, Tappel AL. Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation. *Lipids.* 1966;1:282-4.

Minotti G, Aust D. The role of Iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 1987;44:191-208.

Minotti G, Aust SD. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids.* 1992;27:219-26.

Miras-Parra FJ. Metabolismo pulmonar del ácido palmítico y colesterol: estudio experimental [Tesis]. Universidad de Granada; 1981.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.



Monte M, Sacerdote de Lustig E. Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos biológicos y médicos. Medicina (Buenos Aires). 1994;54:61-8.

Moon Y, Lee KH, Park JH, Deum D, Kim K. Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. J Neurochem. 2005;93(5):1199-208.

Morales J, Selman M, Díaz X. Biopsia pulmonar transpleural por toracoscopia en el diagnóstico de la neumopatía intersticial difusa. Arch Bronconeumol. 1986;22:215-8.

Mosialou E; Ekstrom G, Adang AE, Morgenstern R. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1993;45(8):1645-51.

Mossman BT. Mechanisms of action of poorly soluble particulates in overload-related lung pathology. Inhal Toxicol. 2000;12(1-2):141-8.

Mukai K, Morimoto H, Kikuchi S, Nagaoka S. Kinetic study of free radical scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. Biochim Biophys Acta. 1993;1157:313-7.

Nacamura H, Fujishima S, Waki Y, Urano T. Priming of alveolar macrophages for interleukin-8 production in patients with pulmonary idiopathic fibrosis. *Am Respir J Crit Care Med.* 1995;152:1579-86.

Nagaoka S, Okauchi Y, Urano S, Nagashima U, Mukai K. Kinetic and ab initio study of the prooxidant effect of vitamin E. hydrogen abstraction from fatty acid esters and egg yolk lecithin. *J Am Chem Soc.* 1990;112:8921-4.

Nieto N. Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. 1993.

Niki E.  $\alpha$ -Tocoferol. In: Packer L, Cárdenas E, editores. *Handbook of Antioxidants.* New York: Marcel Dekker; 1995. p. 3-25.

Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi N, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62(6 Suppl):S1322-6.

Nohl H, Kozlov AV, Staniek K, Gille L. The multiple functions of coenzyme Q. *Bioorg Chem.* 2001;29(1):1-13.

Oda H, Kadota JI, Kohno S. Leucotriene B<sub>4</sub> in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Chest.* 1995;108:116-22.

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo GY, Nicoreta P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends. Pharmacol Sci.* 1989;10:281-5.

Orrenius S, Moldeus P, Theor H. In: Ulrich V, Roots I, Hilderbrant A, editors. *Microsomes and drugs oxidation*. New York: Pergamon Press; 1977. p. 292-309.

Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:S1050-5.

Palozza P. Can beta-carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1740(2):215-21.

Palozza P, Krinsky NI. Beta-carotene and alpha-tocopherol are synergist antioxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1992;297:184-7.

Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, Piccioni E, Calviello G. Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Mol Aspects Med*. 2003;24(6):353-62

Peña de la A, Redondo P. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Rev Clin Espa*. 1997;197:434-46.

Pérez-Padilla R, Salas J, Chalpela R. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:49-53.

Persoons J, Schornagel K, Brevé J. Acute stress affects citoquines and nitric oxid production by alveolar macrophages differently. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:619-24.

Peters SG, McDougall JC, Douglas W. Colchicine in the treatment of pulmonary fibrosis. *Chest*. 1993;103:101-4.

Peterson M, Kirschbaum J. Asbestos-induced lung epithelial permeability: potential role of nonoxidant pathways. *Am J Physiol*. 1998;275:L262-L268.

Poli G, Cheeseman KH, Dianzani MU, Slater TF. The role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced damage to liver microsomal enzymes. Comparative studies using microsomes and isolated liver cells. *Chemico-Biological Interactions*. 1981;37:13-24.

Poli G. Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):604-20.

Polyakov NE, Kruppa AI, Leshina TV, Konovalova TA, Kispert LD. Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(1):43-52.

Porter NA. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). In: Vigo-Pelfrey C, editor. *Membrane lipids oxidation*. Boca Ratón: CRC Press; 1990. p. 33-62.

Pryor WA. Vitamin E and Heart disease: Basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(1):141-64.

Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):60-8.

Ramón JR. *Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana.* Madrid: IDEPSA; 1993.

Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *British Medical Bulletin.* 1993;49(3):556-65.

Ritcher C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *The Chemistry and Physics of Lipids.* 1987;44:175-89.

Ritcher C, Park JW, Arnes BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:6465-7.

Roberfroid M, Romero-Calderón P. *Free radical and oxidation phenomena in biological systems.* New York: Marcel Dekker; 1995.

Roche E, Romero-Alvira D. Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Med Clin.* 1996;106:144-53.

Romero Alvira C, González Martínez F. Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An Esp Pediatr.* 1992;36(2):85-97.

Romero D, Bueno J. Radicales libres del oxígeno y antioxidantes en medicina. *Rev Clin Espa.* 1989;184:345-6.

Rossi MA, Fidale F, Ganamone A, Esterbauer H, Dianzani MU. Effect of 4-hydroxyalkenals on hepatic phospholipase C. *Biochemical Pharmacology*. 1990;39:1715-9.

Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischaemia: conversion of xantine dehydrogenase to xantine oxidase. In: Greenwald y Cohen, editors. *Oxy radicals and their scavenger systems*. New York: Elsevier Science Publishing; 1983. p. 145-53.

Ryrfeldt A, Bammenberg G, Moldius P. Free radical and lung disease. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):588-603.

Saran M, Bors W. Radical Reactions in vivo-an overview. *Radiat Environ Biophys*. 1990;29:249-62.

Saran M, Michel C, Bors W. Relations of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radical Res Commun*. 1989;10:221-6.

Schaich KM. Metals and lipid oxidation: contemporary issues. *Lipids*. 1992;27:209-18.

Schins RP, Borm PJ. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Ann Occup Hyg*. 1999;43:7-33.

Scott MD, Eaton JW, Kuypers FA. Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidants defense. *Blood*. 1989;74:2542-9.

Searle AJF, Wilson RL. Stimulation of microsomal lipid peroxidation by iron and cysteine. Characterization and the role of free radicals. *Biochem.* 1983;212:549-64.

Selman M. En: *Neumopatías intersticiales difusas*. México: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1996.

Selman M, Talmadge E, Pardo A. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134:136-51.

Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs.* 2004;64:405-30.

Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:S1129-34.

Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr.* 1985;5:365-90.

Siems W, Wiswedel I, Salerno C, Crifo C, Augustin W, Schild L, et al. Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions- potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *J Nutr Biochem.* 2005;16(7):385-97.

Sies H, Kaiser S, Di Mascio P, Murphy ME. Scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. In: Packer L, Cadenas E, editors.

Vitamin E in health and disease. New York: Marcel Dekker 1993. p. 141-52.

Simic MG, Jovanovic SV. Antioxidation mechanism of uric acid. *J Am Chem Soc.* 1989;111:5778-82.

Simpson KL, Chichester CO. Metabolism and nutritional significance of carotenoids. *Ann Rev Nutr.* 1981;1:351-74.

Singal PK, Hill M, Thomas TP. "Endogenous antioxidant changes in the myocardium in response to acute and chronic stress conditions". *Mol Cell Biochem.* 1993;129:179-86.

Sjodin B, Hellstern-Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 1990;10:236-54.

Slater TF, Cheeseman KH. Lipid peroxidation. In: Bendetto RG, McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF, editors. *Prostaglandins and related substances.* Oxford: IRL Press; 1987. p. 243-58.

Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222:1-15.

Sogut S, Ozyurt H, Armutcu F, Kart L, Iraz M, Akyol O, et al. Erdosteine prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;494(2-3):213-20.



Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:9943-7.

Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of protein. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:S1125-8.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biol Med*. 1990;9:315-25.

Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24(6):345-51.

Stoller JK, Rankin JA, Reynolds HY. The impact of bronchoalveolar lavage cell analysis on clinicians' diagnostic reasoning about interstitial lung disease. *Chest*. 1987;92:839-43.

Strieter RM. Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1206-7.

Stubbe J. Ribonucleotide reductase; amazing and confusing. *J Biol Chem*. 1990;265:5329-32.

Sueiro Bendito A, Gaudó Navarro J. Fibrosis pulmonar idiopática. En: Caminero JA, Fernández L, editores. *Manual de Neumología y Cirugía Torácica*. SEPAR. Madrid: Editores Médicos D.L.; 1998. p. 917-40.

Sun F, Hayami S, Ogiri Y, Haruna S, Tanaka K, Yamada Y, et al. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1500:181-5.

Sundar SV, Li YY, Rollwagen FM, Maheshwari RK. Hemorrhagic shock induces differential gene expression and apoptosis in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(3):688-96.

Talmadge E. Interstitial lung diseases. In: Casper DL, Fanci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Hameson JL, et al., editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 1554-60.

Tamer L, Calikoglu M, Ates NA, Yildirim H, Ercan B, Saritas E, et al. Glutathione-S-Transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology*. 2004; 9(4):493-8.

Tappel A. Will antioxidant nutrients slow aging process?. *Geriatrics*. 1968;23:97-105.

Tenholder MF, Russell MD, Knight E, Rajagopal KR. Orthodeoxia: a new finding in interstitial fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1987;136:170-3.

Turrens JF, Borevis A. Generation of superoxide anion by the NADH deshydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*. 1990;191:421-7.

Ursini F, Maiorino M, Sevanian A. Membrane hidroperoxides. In: Sies H, editor. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London: Academic Press; 1991. p. 319-36.

Vademecum Internacional. 46 ed. Madrid: Medicom SA; 2005. p. 468-9.

Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. Life Sciences. 1991;48:301-9.

Vallyathan NV, Craighead JE. Pulmonary pathology in workers exposed to nonasbestiform talc. Hum Pathol. 1981;12:28-35.

Van Hoozen BE, Grimmer KL, Marelich GP, Armstrong LC, Last JA. Early phase collagen synthesis in lungs of rats exposed to bleomycin. Toxicology. 2000;147(1):1-13.

Von Sonntag C. The chemical basis of radiation biology. London: Taylor and Francis. 1987.

Walker Ch, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwartz F et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. Am J Respir Crit Care Med. 1994;150:1038-48.

Ward WF, Shih-Hoellwarth A, Tuttle RD. Collagen acumulation in irradiated rat lung modification by D-penicillamine. Radiology. 1983;146:533-7.

Warholm M, Cuthenberg C, Von Barh C, Mannervick B. Glutathione transferases from human liver. *Methods in enzymology*. 1985;113:499-504.

Warshamana GS, Corti M, Brody AR. TNF-alpha, PDGF, and TGF-beta(1) expression by primary mouse bronchiolar-alveolar epithelial and mesenchymal cells: TNF-alpha induces TGF-beta(1). *Exp Mol Pathol*. 2001;71(1):13-33.

Weffers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem*. 1988;174:353-7.

Weitberg AB, Weizman SA, Clarke EP. Effects of antioxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J Clin Invest*. 1995;75:1835.

Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism. *Am J Respir Crit Care*. 2000;162:755-8.

Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):507-22.

Winterbauer RH. The treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 1991;100:233-5.

Witing LA. Vitamin E and lipid antioxidants in free radical initiated reactions. In: Pryor A, editor. Free radicals in biology. London: Academic Press; 1980. p. 259-319.

Wolf SP, Crabba MJC, Thornalley PJ. The autoxidation of simple monosacharides. *Experientia*. 1984;40:244-6.

Wolf SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein oxidation: The role of autoxidative glycosilation in diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*. 1987;245:243-50.

Wolf SP. Diabetes Mellitus and free radicals. *British Medical Bulletin*. 1993;49(3):642-52.

Xaubet A, Morell F. Enfermedades intersticiales difusas del pulmón. En: Auxina V, Ballus C, Callejas JM, Cardellach F, Carmena R, Carreres A et al., editores. *Farreras/Rozman Medicina Interna*. 12 ed. Madrid: Harcourt; 2000. p. 923-35.

Yildirim Z, Kotuk M, Iraz M, Kuku I, Ulu R, Armutcu F, et al. Attenuation of bleomycin-induced lung fibrosis by oral sulfhydryl containing antioxidants in rats: erdosteina and N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005;18(5):367-73.

Yildirim Z, Turkoz Y, Kotuk M, Armutcu F, Gurel A, Iraz M, et al. Effects of aminoguanidine and antioxidant erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Nitric Oxide*. 2004;11(2):156-65.

Yucesoy B, Johnson VJ, Kashon ML, Fluharty K, Vallyathan V, Luster MI. Lack of association between antioxidant gene polymorphisms and progressive massive fibrosis in coal miners. *Thorax*. 2005;60:492-5.

Zhang P, Omaye ST. Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Toxicology*. 2000;146(1):37-47.

Zhang Y, Fong CC, Wong MS, Tzang CH, Lai WP, Fong WF, et al. Molecular mechanisms of survival and apoptosis in RAW 264.7 macrophages under oxidative stress. *Apoptosis*. 2005;10(3):545-56.

## **ANEXO: TABLAS**





	CONTROL	FIBROSIS	FIBROSIS + ANTIOXIDANTE
<b>PESO RATAS AL SACRIFICIO</b>	551,16±16 a	449,6±19,03 b	373,5±25,95 b
<b>PESO HÍGADOS AL SACRIFICIO</b>	16,77±0,97 a	12,96±0,58 b	9,86±0,88 b
<b>PESO PULMONES AL SACRIFICIO</b>	22,63±0,45 a	19,9±0,14 a	20,61±0,25 a

**Tabla 1.- Resultados generales.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

	CONTROL	FIBROSIS	FIBROSIS + ANTIOXIDANTE
<b>TBARS</b> nmol/ml	16,7±2,26 a	13,57±1,85 a	11,68±1,57 a
<b>COENZIMA Q<sub>9</sub></b> mcg/ml	25,72±3,34 a	14,17±2,31 b	29,62±2,83 a
<b>VITAMINA E</b> mcg/ml	2,67±0,84 a	2,71±0,31 a	6,87±1,15 b
<b>VITAMINA A</b> ng/ml	206,29±18,98 a	106,96±7,52 b	152,88±11,76 ab

**Tabla 2.- Resultados en plasma.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

	<b>CONTROL</b>	<b>FIBROSIS</b>	<b>FIBROSIS + ANTIOXIDANTE</b>
<b>PROTEÍNA</b> mg/g hígado fresco	22,24±1,24 a	35,42±2,79 b	29,28±1,13 b
<b>TBARS</b> nmol/g hígado fresco	31±4,55 a	55,05±10,14 a	57,85±5,12 a
<b>TBARS</b> nmol/mg de proteína	3,25±0,32 a	2,52±0,25 a	2,5±30,19 a
<b>HIDROPEROXIDOS</b> mcmol/g híg. fresco	132±20,15 a	149,34±22,49 a	177,18±16,12 a
<b>HIDROPEROXIDOS</b> mcmol/mg proteína	11,99±0,34 a	6,92±0,45 b	7,55±0,38 b
<b>COENZIMA Q<sub>9</sub></b> nmol/g hígado fresco	708,76±168,85 a	807,69±103,62 a	1764,52±216,86 b
<b>COENZIMA Q<sub>9</sub></b> nmol/mg de proteína	61,32±5,86 a	38,41±4,06 ab	76,44±8,75 ac
<b>COENZIMA Q<sub>10</sub></b> nmol/g hígado fresco	104,63±24,70 a	93,62±16,84 ab	186,05±13,83 c
<b>COENZIMA Q<sub>10</sub></b> nmol/mg de proteína	9,18±1,21 a	4,42±0,64 b	8,14±0,63 ac
<b>VITAMINA A</b> ng/g de hígado fresco	4829,68±1516,71 a	5368,31±1076,41 a	8452,46±1040,73 a
<b>VITAMINA A</b> ng/mg de proteína	392,05±65,17 a	237,62±21,80 b	363,86±33,89 ac

**Tabla 3.- Resultados en mitocondrias de hígado.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

	<b>CONTROL</b>	<b>FIBROSIS</b>	<b>FIBROSIS + ANTIOXIDANTE</b>
<b>SOD</b> U/mg de proteína	6,37±0,81 a	3,67±0,59 b	1,75±0,33 c
<b>CATALASA</b> sg-1 x mg-1	0,33±0,02 a	0,26±0,02 ab	0,19±0,02 c
<b>GPX</b> U/mg de proteína	0,09±0,01 a	0,06±0,007 a	0,059±0,004 a

**Tabla 4.- Resultados en citosol de hígado.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

	<b>CONTROL</b>	<b>FIBROSIS</b>	<b>FIBROSIS + ANTIOXIDANTE</b>
<b>PROTEÍNA</b> mg/g pulmón fresco	4,25±0,29 a	4,57±0,34 a	5,25±0,35 a
<b>TBARS</b> nmol/g pulmón fresco	113,80±14,20 a	100,14±8,49 a	114,99±6,20 a
<b>TBARS</b> nmol/mg de proteína	13,27±1,53 a	10,67±0,82 a	10,22±0,35 a
<b>HIDROPEROXIDOS</b> mcmol/g pulmón fresco	121,89±7,16 a	137,42±13,80 a	110±11,26 a
<b>HIDROPEROXIDOS</b> mcmol/mg de proteína	14,28±0,98 a	13,99±0,52 ab	9,68±0,79 c
<b>COENZIMA Q<sub>9</sub></b> nmol/g pulmón fresco	355,13 ±7,20 a	231,66±43,11 ab	563,74±97,79 ac
<b>COENZIMA Q<sub>9</sub></b> nmol/mg de proteína	41,40±3,04 a	22,10±3,26 ab	51,02±9,12 ac
<b>COENZIMA Q<sub>10</sub></b> nmol/g pulmón fresco	36,43±5,39 a	28,37±5,56 ab	58,90±8,75 ac
<b>COENZIMA Q<sub>10</sub></b> nmol/mg de proteína	4,19±0,52 a	2,73±0,54 ab	5,31±0,77 ac
<b>VITAMINA A</b> ng/g pulmón fresco	89,94±14,92 a	39,14±7,55 b	63,58±9,40 ab
<b>VITAMINA A</b> ng/mg de proteína	10,37±1,62 a	3,75±0,61 b	5,69±0,90 b

**Tabla 5.- Resultados en mitocondrias de pulmón.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

	<b>CONTROL</b>	<b>FIBROSIS</b>	<b>FIBROSIS + ANTIOXIDANTE</b>
<b>SOD</b> U/mg de proteína	15,90±0,99 a	14,51±1,22 a	12,98±1,89 a
<b>CATALASA</b> Seg-1 x mg-1	1,24±0,22 a	0,73±0,13 a	0,71±0,10 a
<b>GPX</b> U/mg de proteína	0,147±0,009 a	0,113±0,012 a	0,057±0,005 b

**Tabla 6.- Resultados en citosol de pulmón.** Los datos representan la media ± EEM. Para cada parámetro los valores que no tienen letras coincidentes presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).