

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**"EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ALOPURINOL SOBRE LA DISFUNCIÓN  
ENDOTELIAL PRODUCIDA POR HIPERGLICEMIA AGUDA EN TEJIDO  
AÓRTICO DE RATAS NORMALES, AREQUIPA 2013".**

**Plan de tesis presentado por los Bachilleres:**

CHAVEZ TOLEDO, Miguel Fuad

MONROY PASTRANA, Roberth Fabricio

**Para optar el Título Profesional de:**

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**Asesor:**

Dra. Roxana Gutierrez Aranibar

**AREQUIPA - PERÚ**

**2014**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Deysi y Vidal, por su constancia, su apoyo, su paciencia y la dedicación que han tenido conmigo, y sobre todo por sus consejos, porque ustedes son mi ejemplo a seguir de superación.*

*A mis hermanos, Omar y Ángel, por estar conmigo cuando más lo necesitaba, acompañando brindando su apoyo.*

*A la Tuna de la Universidad Católica de Santa María, por ser en todos sus integrantes ahora considerados mis hermanos, quienes me apoyaron y estuvieron en los momentos complicados.*

**Miguel**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Segundo y Andrea, con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.*

*A mi hermano Giancarlo y mi sobrino Gianluca, que con sus palabras y buenos deseos me dieron mucha fuerza para seguir adelante y cumplir una de mis primeras metas.*

*A tu paciencia y comprensión preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío, por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, ahora puedo decir que esta Tesis lleva mucho de ti, gracias por estar a mi lado, Tania.*

*A la memoria de mi amigo, Edu quien fue mi compañero en las buenas y malas, que con sus palabras me motivo a ser una persona de bien.*

**Fabricio**

## AGRADECIMIENTO

*A DIOS, por haber puesto en nuestros caminos, en estos años de estudio a las personas indicadas y guiar nuestros pasos.*

*A nuestros padres, por estar con nosotros en todo momento, por el apoyo que nos brindaron, por la formación y por fomentar en nosotros el deseo de saber y conocer.*

*A la Doctora Roxana Gutiérrez Aranibar por su ayuda y colaboración para realizar la presente investigación.*

*Un sincero agradecimiento al Doctor Azael Paz Ariaga por su apoyo, sus consejos y colaboración constante.*

*Un especial agradecimiento a la Sra. María Meneses Mares, por su ayuda, colaboración incondicional y orientación para llegar a ser buenas profesionales.*

*Finalmente a todas aquellas personas, familiares y amigos que están siempre en los momentos importantes de nuestras vidas, así como durante la etapa de realización de este estudio*

## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>7</b>
<b>HIPOTESIS .....</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>11</b>
<b>MARCO TEORICO .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Vasos Sanguíneos.-.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Endotelio.-.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Disfunción endotelial.-.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Radicales Libres.- .....</b>	<b>17</b>
<b>5. Oxidación.-.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Estrés Oxidativo.- .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Los Estresores Exógenos.- .....</b>	<b>39</b>
<b>8. Antioxidantes.-.....</b>	<b>40</b>
<b>9. Alopurinol.-.....</b>	<b>42</b>
<b>10. Diabetes.- .....</b>	<b>51</b>
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>1. MATERIALES Y REACTIVOS.- .....</b>	<b>55</b>
<b>2. METODOS.- .....</b>	<b>56</b>
<b>2.1. Técnica de obtención de los anillos aórticos de ratas.-.....</b>	<b>56</b>
<b>2.2. Inserción de los anillos aislados en la cámara de órganos aislados.-.....</b>	<b>56</b>
<b>2.3. Protocolo de administración de los fármacos en estudio.- .....</b>	<b>57</b>
<b>2.4. Obtención de la respuesta con dosis suprafisiológica de glucosa.- .....</b>	<b>58</b>

<i>2.5. Efecto del tratamiento antioxidante del alopurinol sobre el deterioro de la vasodilatación de anillos de aorta aislados con hiperglucemia aguda.-</i> .....	58
<i>2.6. Efecto sobre el incremento de radicales libres (acción antioxidante) del alopurinol observada a través de la vasocontracción inducida con NA.</i> .....	59
<i>2.7. Análisis Estadístico.-</i> .....	59
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>61</b>
RESULTADOS .....	61
<b>1. TABLA N° 1.-</b> .....	62
<b>2. TABLA N° 2.-</b> .....	64
<b>3. TABLA N° 3.-</b> .....	66
<b>4. TABLA N° 4.-</b> .....	68
DISCUSIÓN.....	71
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>74</b>
CONCLUSIONES.....	74
SUGERENCIAS .....	75

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación nuestro objetivo fue evaluar el efecto antioxidante del Alopurinol frente a la respuesta vasodilatadora a 3 concentraciones crecientes de Acetilcolina; para ello provocamos hiperglicemia aguda sumergiendo anillos de aorta en una dosis de 45 mMolar de Glucosa, después de 6 horas se extrae las aortas y se las somete a la cámara de órganos aislados, aplicamos las 3 dosis de Acetilcolina previa contracción de Norepinefrina observando una vasodilatación de 40% frente a un 81% de relajación normal, incubando las aortas así oxidadas con Alopurinol a la concentración de  $10^{-4}$  M durante 20 minutos, luego, extraídas del medio e insertadas en el baño de órganos se demostró cómo se recuperó el mecanismo vasodilatador hasta el 72 %, por lo cual se comprobó el efecto del Alopurinol en la reducción de radicales libres lo cual permite un mayor incremento de Óxido Nítrico y en consecuencia la Vasodilatación.

Para corroborar que el efecto del Alopurinol se da a través de su propiedad antioxidante se incubo simultáneamente Hipoxantina oxidasa y Glucosa a 45mMolar para registrar su respuesta vasoconstrictora a la Norepinefrina.

Se encontró un incremento aproximado de un 40% del efecto vasoconstrictor, producto de la generación de radicales libre por la reacción.

Luego en la adición al baño de órganos de Alopurinol junto con la Xantina Oxidasa e Hipoxantina se observa la reducción del efecto vasoconstrictor aproximadamente a un 23% lo cual demuestra que es mediante su efecto antioxidante que está probado la función del Alopurinol.

El trabajo concluye en que el Alopurinol tiene mecanismo antioxidante y permite recuperar la relajación deteriorada por la incubación de los anillos aórticos en Glucosa de 45 mMolar.



### ABSTRACT

In the present investigation our objective was to evaluate the antioxidant effect of allopurinol against the vasodilatory response to 3 increasing concentrations of acetylcholine, for it provoke sharp hyperglycemia dipping aortic rings in a dose of 45 mMolar Glucose, after 6 hours aortas extracted and subjected to camera isolated organ, apply the 3 doses of Acetylcholine Norepinephrine contraction after watching vasodilation of 40% versus 81% normal relaxation, incubating the aortas and oxidized to the concentration of Allopurinol  $10^{-4}$  M for 20 minutes, then removed from the middle and inserted in the organ bath was shown how the vasodilator mechanism up to 72% was recovered, so the effect of allopurinol was found in the reduction of free radicals which allows a further increase of nitric oxide and vasodilation accordingly.

To confirm that the effect of allopurinol is given through its antioxidant property simultaneously incubated with glucose oxidase and Hypoxanthine 45mMolar to register your vasoconstrictor response to Norepinefirna .

One approximate increase of 40% of the vasoconstrictor effect resulting from the generation of free radicals by the reaction was found.

Then in addition to the organ bath along with Allopurinol Xanthine Hypoxanthine Oxidase and reduced vasoconstrictor effect is observed approximately 23% which shows that it is through its antioxidant effect is proven Allopurinol function.

The study concludes that allopurinol has antioxidant mechanism and allows recovering the impaired relaxation by incubation of aortic rings Glucose 45 mMolar.



## INTRODUCCION

En los últimos 30 años se viene desarrollando cada día un interés mayor por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes, todo esto dado por la importancia que poseen en la bioquímica, la biología y la medicina.

En el organismo existe un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se descompensa a favor de las especies reactivas de oxígeno se produce el denominado estrés oxidativo.

Existen evidencias que el daño oxidativo debido a la hiperglicemia contribuye a las patologías microvasculares de la diabetes. Se conoce como estrés oxidativo al desbalance entre los radicales libres y los agentes antioxidantes. Recientemente se ha sugerido que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) generadas principalmente dentro de la mitocondria, puede ser la clave central en muchas de las patologías de la diabetes.

El endotelio vascular controla la homeostasis del tono vascular, permeabilidad, coagulación, fibrinólisis, proliferación celular y la respuesta antiinflamatoria. En presencia de factores de riesgo cardiovascular parece un cambio fenotipo en las células endoteliales hacia un perfil inflamatorio, situación que se conoce como disfunción endotelial.

La diabetes mellitus, especialmente en el contexto del síndrome metabólico, origina disfunción endotelial con incremento de factores oxidantes, vasoconstrictores, proliferativos y procoagulantes.

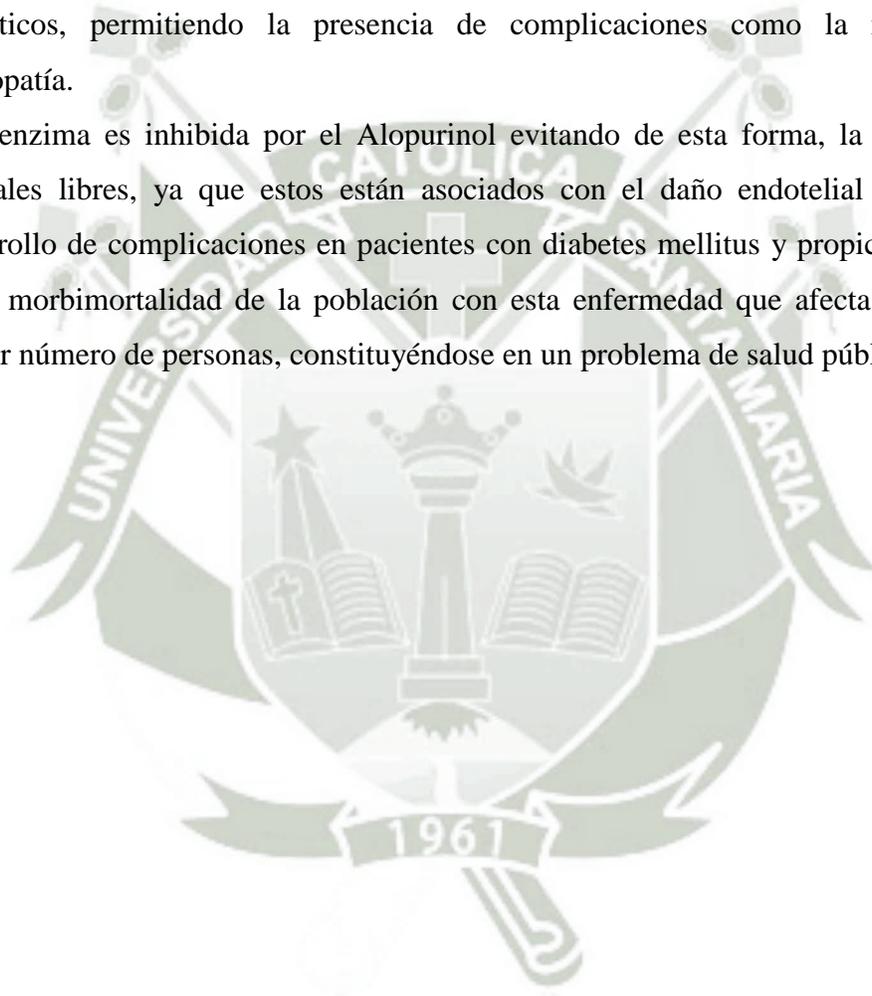
Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. Estas sustancias tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas.

Un antioxidante es aquella sustancia que presenta baja concentraciones respecto a la de un sustrato oxidable (biomolécula) que retarda o previene su oxidación.

A nivel mundial los estudios básicamente señalan el efecto del Alopurinol en patologías asociadas con daño cardiovascular, con hipertensión, con hipercolesterolemia y hiperuricemia.

La xantina oxidasa una enzima que normalmente está presente en el endotelio y que cataliza la degradación de hipoxantina a ácido úrico, se caracteriza por producir, como bioproductos del metabolismo normal, gran cantidad superóxidos, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo, lo cual incrementa el daño endotelial en pacientes diabéticos, permitiendo la presencia de complicaciones como la nefropatía y/o retinopatía.

Esta enzima es inhibida por el Alopurinol evitando de esta forma, la producción de radicales libres, ya que estos están asociados con el daño endotelial que genera el desarrollo de complicaciones en pacientes con diabetes mellitus y propicia un aumento en la morbimortalidad de la población con esta enfermedad que afecta cada día a un mayor número de personas, constituyéndose en un problema de salud pública.



## HIPOTESIS

Debido a que el Alopurinol es metabolizado a oxipurinol que es un inhibidor de las xantina oxidasa y ejerce una acción inhibitoria de la producción de radicales libres al impedir el paso de hipoxantina a xantina. Es probable que el tratamiento con alopurinol agregado al medio de incubación sobre anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicemicas con disfunción endotelial permita la recuperación de la respuesta normal a agentes vasodilatadores.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la administración de alopurinol controla la disfunción endotelial inducida por hiperglicemia aguda recuperando la actividad vascular de anillos aislados de aorta torácica de ratas.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar las respuesta patrón vasodilatadora a tres dosis crecientes de acetilcolina en anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicémicas previamente contraídas al 100% con norepinefrina.
- Evaluar el efecto vasodilatador a tres (3) dosis crecientes de acetilcolina en anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicémicas expuestas previamente a hiperglicemia aguda mediante su incubación en una solución de glucosa.
- Demostrar el efecto del tratamiento con alopurinol sobre la recuperación vasodilatadora de anillos aislados de aorta con disfunción Endotelial.
- Observar el efecto del alopurinol sobre la producción de radicales libres como resultado de la conversión de hipoxantina a xantina y a acido úirco..

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1. Vasos Sanguíneos.-

El sistema de los vasos sanguíneos asegura que la sangre impulsada al corazón llegue a todos los tejidos del organismo y que en ellos se pueda llevar el intercambio de sustancias útiles y productos de desecho entre el plasma y las células, así como el retorno de la sangre al corazón. Para ello las grandes ramas arteriales, que salen del corazón, se ramifican mucho en vasos cada vez más pequeños hasta formarse los capilares sanguíneos de pared muy fina (idónea para los intercambios de sustancias), los cuales convergen en pequeñas venas que se irán uniendo para formar venas cada vez mayores y conducir, por este sistema venoso la sangre de nuevo al corazón.<sup>(10)</sup>

Los vasos sanguíneos no son simples conductos que transportan sangre, ya que la pared vascular es considerada actualmente como un “órgano” que ejerce funciones que participan de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Las células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos participan en la regulación del flujo sanguíneo, la formación de trombos y la adhesión de leucocitos, mantienen la estructura parietal, traducen fuerzas biomecánicas y estímulos humorales<sup>(28)</sup>.

Todos los vasos sanguíneos que superan un determinado calibre presentan tres capas concéntricas que se denominan:

### 1.1. La Capa o túnica Intima.-

Delimita la luz vascular y está formada por un **endotelio** (epitelio plano simple) con su membrana basal. Puede estar recubierto por una capa subendotelial de tejido conjuntivo laxo y a veces una capa muscular dispersa. <sup>(10)</sup> (Fig.: 1.1).

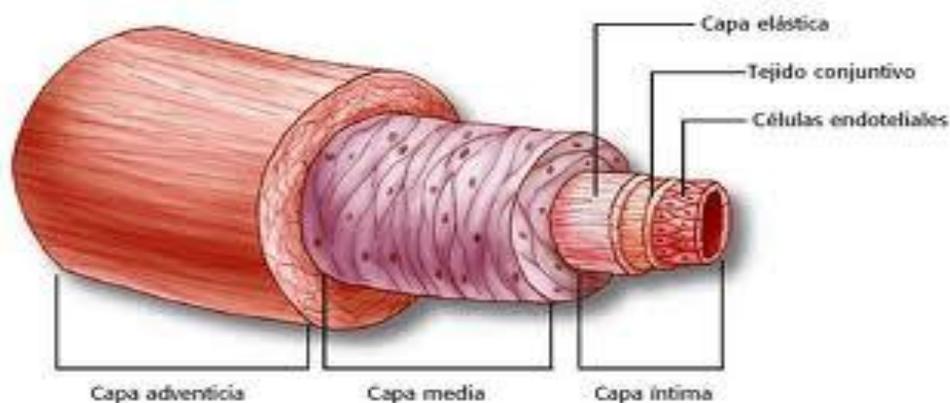
### 1.2. La Capa o túnica Media.-

Está formada por tejido conjuntivo que, según el vaso, puede tener distinta cantidad de fibras elásticas, y por capas de fibras musculares lisas, cuya cantidad también varía según el vaso. <sup>(10)</sup> (Fig.: 1.1).

### 1.3. La Capa adventicia.-

Está formado por tejido conjuntivo que se continúa con el conjuntivo de los tejidos por los que circula el vaso.

Entre la túnica íntima y la media puede aparecer la lámina elástica interna que está formada principalmente por fibras elásticas y según el vaso está más o menos desarrollada o no existe. Entre la túnica media y la adventicia, puede aparecer la lámina elástica externa, formada por fibras elásticas, es más delegada que la interna y según el tiempo de vaso está más o menos desarrollada o no existe. <sup>(10)</sup> (Fig.: 1.1).



**FIGURA N° 1.1:** Capas concéntricas de los Vasos Sanguíneos.

Dentro de esta estructura el endotelio vascular actúa como receptor y transmisor de señales. Las células endoteliales son capaces de registrar cambios hemodinámicos de la sangre, y son consideradas como el principal órgano de regulación vascular con acciones exocrina, paracrina y autocrina. Entre los factores biológicamente activos sintetizados y liberados por las células endoteliales cabe destacar: la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el óxido nítrico (NO), la endotelina (ET), entre muchos otros <sup>(28)</sup>.

Existen tres tipos de células musculares que presentan una localización, estructura y función diferente en el organismo animal, las que se agrupan en los llamados músculo esquelético, liso y cardíaco <sup>(28)</sup>.

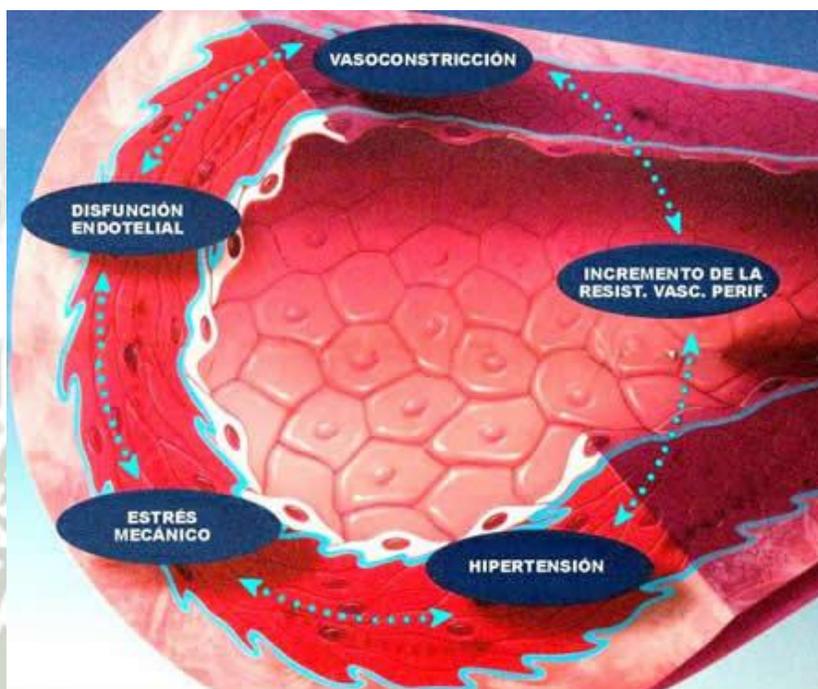
El músculo liso se distingue, en el aspecto anatómico, de los músculos esqueléticos y cardíacos porque no tiene estrías transversales visibles. Tiene actina y miosina II, que se deslizan la una sobre la otra para producir la contracción <sup>(11)</sup>.

## 2. Endotelio.-

El endotelio, en la frontera entre la sangre y los tejidos es mucho más que una capa sencilla de revestimiento celular que recubre por completo el interior del corazón, de los vasos sanguíneos (arteriales y venosos) y linfáticos, de los cuerpos cavernosos. De forma sorprendente, ha sido pesado (3,5 – 4,5 kg) y medido, con una superficie total equivalente a seis canchas de tenis. Es considerado por ello el mayor “órgano virtual” de nuestro organismo. Como tal órgano además de un sustrato histológico, tiene dos grandes funciones, la de regular el tránsito de 7,200 litros diarios de sangre, permitiendo la salida de una cantidad inferior al 0,1% de líquidos hacia los tejidos, y la de coordinar de una forma armonizada toda la “funcionalidad de la celularidad vecina”, vascular y extravascular. <sup>(21)</sup>

## 2.1. Funciones del endotelio.-

Desde su identificación microscópica como una capa unicelular que sólo dividía dos compartimentos: humoral y tisular, (Fig.: 1.2) se ha reconocido al endotelio como el órgano más extenso, y uno de los más importantes del cuerpo. <sup>(2)</sup>



**FIGURA N° 1.2:** Funciones del Endotelio: Compartimentos humoral y tisular.

En su conjunto, pesa más que el hígado, su masa es equivalente a varios corazones, y desplegado, llega a cubrir numerosas canchas de tenis, pero el hecho más importante es su capacidad de producir más de 60 moléculas, que cumplen importantes funciones en la hemostasia y homeostasis vascular. <sup>(2)</sup>

La regulación del tono vascular, que realiza mediante la producción de numerosas sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Dentro de las primeras, el **óxido nítrico** (ON) es la molécula antiaterogénica más importante

sintetizada por el endotelio, con propiedades capaces de regular la vasodilatación y con efectos antiproliferativos, antiinflamatorios y antitrombóticos. <sup>(2)</sup>

La contracción de las células del músculo liso vascular depende de tres mecanismos que modifican la homeostasis del calcio intracelular:

- a) Canales de calcio activados por despolarización de membrana, los cuales se abren frente a un cambio de voltaje permitiendo que el calcio extracelular se mueva hacia el interior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico, produciendo la contracción <sup>(16)</sup>.
- b) Contracciones inducidas por agonistas que no despolarizan la membrana, pero activan receptores acoplados a proteína G, modulando respuestas intracelulares que finalmente producen un aumento en la concentración de calcio en el citoplasma produciendo la contracción <sup>(20)</sup>.
- c) Canales de calcio operados por receptores los que son activados por neurotransmisores y hormonas <sup>(16)</sup>.

En términos generales, el control de la musculatura lisa vascular está dado por un control local (intrínseco) determinado por mecanismos como son los de autorregulación, metabólicos, hiperemia activa e hiperemia reactiva, y un control central (extrínseco) que incluye mecanismos humorales y neuronales <sup>(5)</sup>.

Dentro del mecanismo humoral destacan hormonas con acción vasoactiva como angiotensina II, vasopresina, prostaciclina, bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas y catecolaminas circulantes, éstas últimas liberadas por estimulación simpática <sup>(24)</sup>.

### 3. Disfunción endotelial.-

En ocasiones el endotelio se vuelve disfuncionante reaccionando como un epitelio lesionado, segrega los mediadores “erróneos”, pierde su capacidad para mantenerse dilatado y predomina la secreción de sustancias vasoconstrictoras (endotelina, Angiotensina II) sobre las vasodilatadoras (NO, prostaciclina), segregando radicales libres que oxidan la transportadora de colesterol (LDL-col).<sup>(7)</sup>

A este estado denominado disfunción endotelial, puede cuantificarse experimentalmente observando la respuesta de los vasos sanguíneos a la acetilcolina que en disfunción, no responden con un incremento del diámetro vascular con el aumento respectivo del flujo sanguíneo sino, que la respuesta desaparece o por el contrario en situaciones graves responde con vasoconstricción conocido como el efecto paradójico de la acetilcolina. (Fig.: 1.3). El endotelio disfuncionante por hipertensión, hiperlipidemia, tabaquismo o diabetes, muestra un efecto vasoconstrictor paradójico a la acetilcolina.<sup>(7)</sup>

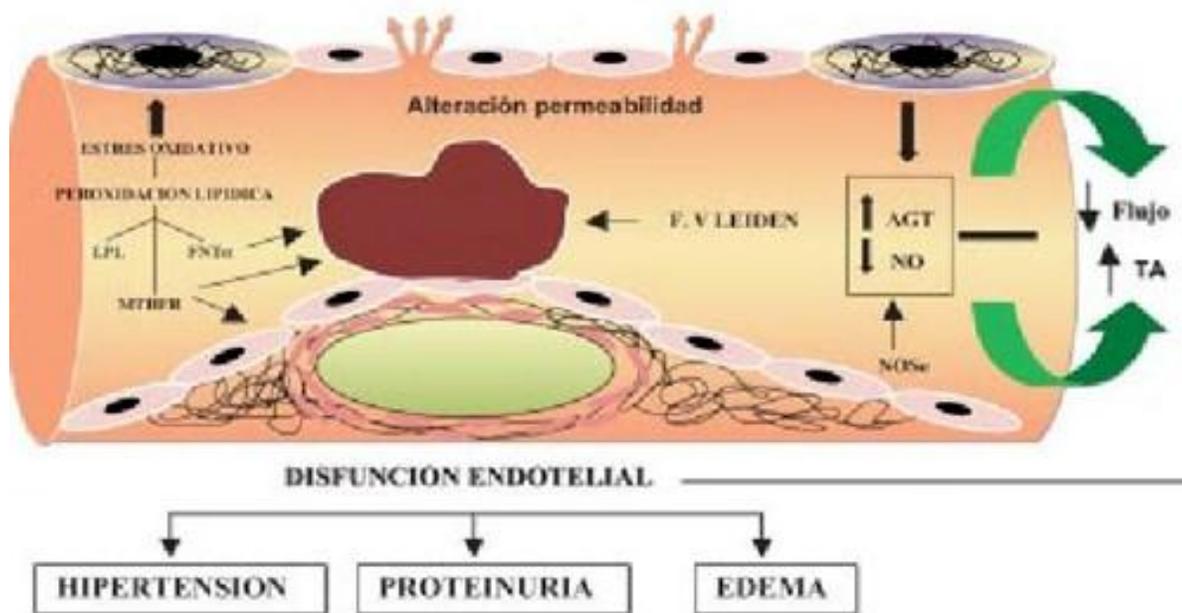


FIGURA N° 1. 3: Disfunción Endotelial: Hipertension, Proteinuria y Edema.

El endotelio disfuncionante se convierte en el eje fundamental de muchas patologías cardiovasculares. Así, está involucrado en el proceso de aterosclerosis, hipertensión arterial, disfunción microcirculatoria, vasoespasmo, síndrome isquemia-reperfusion y aturdimiento miocárdico, proliferación del músculo liso e hiperplasia de la íntima. Es cómplice además del proceso de inflamación, coagulopatías, sepsis y diabetes. <sup>(7)</sup>

### 3.1. Niveles de Alteración Endotelial.-

- A. La **activación endotelial**, fenómeno inicial que ejercita el endotelio diariamente, para mantener la homeostasis de las múltiples funciones que regula. <sup>(7)</sup>
- B. La **disfunción endotelial leve**, por la cual los múltiples factores de riesgo alteran la regulación del endotelio y comienza a primar la producción de moléculas de adhesión y proinflamatorias, asociada a elevadas citosinas. Este estadio es potencialmente reversible con fármacos protectores del endotelio. <sup>(7)</sup>
- C. Finalmente, la fase de **disfunción endotelial avanzada**, con alteraciones profundas anatómicas y funcionales, que favorecen mecanismos inflamatorios y protrombóticos. Además, por tratarse de una etapa más avanzada, la respuesta terapéutica no siempre es efectiva. <sup>(7)</sup>

### 4. Radicales Libres.-

Un radical libre es aquella especie química, que tiene uno o más electrones desapareados en su última capa. Esta característica les proporciona una gran reactividad. <sup>(1)</sup>

La mayor parte del daño oxidativo en los sistemas biológicos se debe a que la utilización del oxígeno por las células da lugar a la generación de radicales libres. <sup>(1)</sup>

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y en las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. <sup>(27)</sup>

#### **4.1. Mecanismos generadores de Radicales Libres.-**

Los radicales libres se generan continuamente en las células expuestas a un ambiente aerobio. Los sistemas enzimáticos antioxidantes han evolucionado paralelamente al metabolismo aerobio para contrarrestar el daño oxidativo debido a estos radicales. A pesar de esta defensa antioxidante, el daño oxidativo sobre las proteínas, lípidos, glúcidos y al DNA, acumulado a lo largo de la vida, está en el origen de enfermedades degenerativas como el Alzheimer. Se han visto implicadas en muchos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas y afecciones broncopulmonares. También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador, la transición fetalneonatal. <sup>(20)</sup>

Los radicales libres se forman en las células en numerosos procesos tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidasa) y en el metabolismo de xenobioticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente. <sup>(20)</sup>

Los radicales libres aparte de las fuentes endógenas descritas anteriormente pueden también proceder de fuentes externas. Con la dieta se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante, el humo de tabaco da lugar a radicales libres, la contaminación ambiental, el ozono, etc. <sup>(20)</sup>

## 4.2. Tipos de radicales libres.-

### 4.2.1. Radical Oxygen Species (ROS) - Radical libres derivados de oxígeno.-

Habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica  $O_2$ , presentando los electrones que forman parte del enlace  $\pi$  antienlace el mismo espín (estado triplete). En esta forma el oxígeno es solo moderadamente reactivo. Sin embargo, por efecto de radiaciones ionizantes, o por la acción de enzimas, o por mecanismos puramente químicos, se pueden generar una serie de especies químicas (radicales libres) capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el organismo y consecuentemente producir daño celular <sup>(20)</sup>.

Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno. Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno *in vivo* se generan con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen  $O_2$  y  $H_2O_2$  <sup>(17)</sup>

Los ROS son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno. Entre los principales ROS tenemos al:

**A. Radical superóxido ( $O_2^-$ ).**

El radical superóxido es la forma dominante al pH fisiológico. En el metabolismo aerobio el 1-2% del consumo total de oxígeno da lugar a la formación de ión superóxido. Es relativamente poco reactivo e inestable, pero potencialmente tóxico. Es inestable y puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Tiene una vida media de algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, que consiste en la reacción entre dos radicales superóxido para dar agua oxigenada y oxígeno<sup>(17)</sup>.



Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc., de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.). Como también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína o la riboflavina, o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial.<sup>(17)</sup>

**B. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).**

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

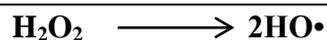


Es un producto estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa, etc, y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre. Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media. Parece que el  $H_2O_2$  está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través del NF- $\kappa$ B y AP-1. Ambos son factores de transcripción capaces de inducir la transcripción de genes tales como de la interleukina 2 (IL - 2), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y c-fos.<sup>(17)</sup>

### C. Radical hidroxilo (HO•).-

Son las especies químicas más reactivas que se conocen y por tanto más tóxicas. Tiene una vida media estimada de alrededor de 10-9s<sup>(20)</sup>.

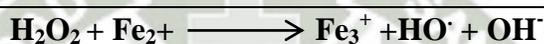
Puede formarse *in vivo* a consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ) que puede provocar la rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo.<sup>(20)</sup>



El radical hidroxil se puede formar a base de la reacción de Haber-Weiss (1934):



Uno de los procesos más importantes de producción de radicales hidroxilo es la reducción del agua oxigenada por ciertos iones metálicos. La reacción de Fenton (Fenton, 1894) utiliza  $\text{Fe}_2^+$  y el peróxido de hidrógeno:



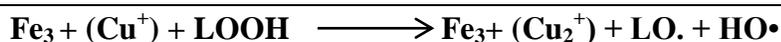
#### D. Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )-

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

Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras<sup>(20)</sup>.

**E. Radical Alcoxilo (RO•).-**

El radical alcoxilo (RO•) se puede formar durante la degradación de los lipoperoxidos en reacciones catalizadas por metales pesados: <sup>(20)</sup>.

**F. Radical peroxilo (ROO•).-**

El radical peroxilo es un producto intermedio de las lipoperoxidación. También se puede formar en reacciones del tipo: <sup>(20)</sup>



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

**G. Ozono (O3).-**

El ozono es un compuesto típico de las capas altas de la atmósfera, donde se forma por reacciones fotoquímicas, puede dar reacciones con compuestos biológicos. <sup>(20)</sup>

**4.2.2. Radicales libres derivados de nitrógeno (RNS).-**

Los radicales libres de nitrógeno representa otra clase de radicales libres a los cuales en los últimos años se les ha dado mucha importancia. Entre las principales especies se encuentran: Óxido nítrico (NO•), Peróxido de nitrógeno (ONOO•) y el Dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>•). <sup>(21)</sup>

### A. Óxido nítrico (NO•).-

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

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, con una vida media relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO• en numerosos tipos. Esta enzima presenta cuatro isoformas: la neuronal nNOS (tipo I), la endotelial eNOS (tipo III) y la inducible iNOS (tipo II).<sup>(21)</sup>

El óxido nítrico juega un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos. Actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibe la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa.<sup>(21)</sup>

Otro efecto del NO• reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.<sup>(21)</sup>

El NO• posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio. Para entender este doble

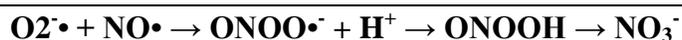
efecto proponen que los efectos reguladores y antiinflamatorios del óxido nítrico ocurren cuando éste ejerce una acción directa sobre una molécula biológica, lo cual ocurre en condiciones fisiológicas, en las que la producción de  $\text{NO}\cdot$  es baja. Sin embargo, cuando las concentraciones de  $\text{NO}\cdot$  aumentan, el  $\text{NO}\cdot$  tiene efectos indirectos, a través de los metabolitos derivados de él, pudiendo reaccionar con el oxígeno o el radical superóxido, lo cual ocurre en situaciones de inflamación.

Un exceso de óxido nítrico es citotóxico. Parte de su citotoxicidad se cree que es debida al  $\cdot\text{O}_2^-$ , con el que reacciona para dar lugar a anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).<sup>(21)</sup>

#### **B. Peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot^-$ )-**

No es un radical, pero sí un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad de modo que es altamente reactivo (Lipton y cols., 1993). Es capaz de inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, de degradar carbohidratos y de fragmentar ADN<sup>(21)</sup>

El anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) se forma por la reacción entre el óxido nítrico con el anión superóxido (Miles, 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



El peroxinitrito está en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tieteres.

Además de las reacciones de oxidación, el peroxinitrito tiene la capacidad para nitrar compuestos fenólicos en condiciones fisiológicas, como los anillos de tirosina. Los residuos de tirosina son oxidados por los radicales derivados del peroxinitrito formando el radical tirosilo, que a su vez reacciona con el  $\text{NO}\bullet$  para formar 3-nitrotirosina.

La nitración mediada por peroxinitrito *in vivo* podría ser inhibida por un exceso de producción relativa de  $\text{O}_2\bullet^-$ , debido a la competencia entre éste y el  $\text{NO}\bullet$  por el radical tirosilo, por lo que la formación de 3-nitrotirosina sería inhibida cuando la tasa de formación de  $\text{O}_2\bullet^-$  superara la de  $\text{NO}\bullet$ .

Asímismo, algunos autores han presentado la reacción de formación del peroxinitrito como una forma de eliminación de  $\text{O}_2\bullet^-$  sin la consiguiente formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo cual supone un efecto detoxificante y antiinflamatorio <sup>(21)</sup>

### C. Dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2\bullet$ )-

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del  $\text{NO}\bullet$  atmosférico. Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica <sup>(17)</sup>.

### 4.3. Fuentes de radicales libres.-

Los radicales libres provienen a través de fuentes Exógenas y Endógenas.

#### 4.3.1. Fuentes Exógenas.-

##### A. Agentes antineoplásicos, Antibióticos.-

Unos principios antineoplásicos como la adriamicina, bleomicina, daunorubicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.<sup>(17)</sup>

##### B. Irradiaciones.-

La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y  $\gamma$  o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ )<sup>(21)</sup>.

##### C. Factores ambientales.-

Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos.

Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación<sup>(20)</sup>.

#### 4.3.2. Fuentes Endógenas.-

##### A. La cadena de transporte electrónico mitocondrial.-

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

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en las que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo una de las causas del estrés oxidativo que sufre la célula. Se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena de transporte electrónico mitocondrial en estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno. Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante. Además, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O<sub>2</sub>, pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado<sup>(17)</sup>.

Una vez formado el anión superóxido, puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres. La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966. Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido.

Se ha estimado que se producen del orden de  $10^{10}$  moléculas de  $\bullet\text{O}_2^-$  por célula y por día <sup>(21)</sup>.

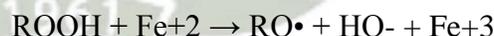
Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio <sup>(21)</sup>.

### **B. Reacción de Fenton-Haber-Weiss.-**

Consiste en la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) y, en menor medida, el cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) y otros iones. El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{+2}$  (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss quienes dieron una primera explicación del mecanismo de reacción: el  $\text{Fe}^{+2}$  reduce al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que a su vez se descompone en el radical hidroxilo y el ion hidroxilo. Esto puede representarse como sigue: <sup>(21)</sup>



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El  $\text{Fe}^{+2}$  se oxida a  $\text{Fe}^{+3}$  con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica. Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato y por el

radical superóxido, con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo: <sup>(21)</sup>



Los procesos de captación y distribución del hierro y de los iones metálicos en general están muy finamente regulados en los mamíferos. Hay un gran número de proteínas de unión a metales (ferritina, transferrina, ceruloplasmina) que actúan como reserva de iones metálicos y que, además, impiden que estos iones participen en reacciones redox <sup>(17)</sup>.

### **C. Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear.-**

Ambos sistemas de membranas intracelulares contienen los citocromos P450 y b5 que pueden oxidar ácidos grasos insaturados. De hecho, los citocromos P450 (término usado para un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidas entre los seres vivos) son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberada en la célula. <sup>(17)</sup>.

### **D. Peroxisomas.-**

Los peroxisomas son potentes fuentes celulares de producción de peróxido de hidrógeno debido a su alta concentración en oxidasas, ninguna de las cuales utiliza el superóxido como precursor del

mismo. Entre estas enzimas están incluidas la D-aminoácido oxidasa, urato oxidasa, L- $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa y acilgraso-coenzima A oxidasa. La catalasa peroxisomal es la enzima que metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas de los peroxisomas. <sup>(17)</sup>.

#### **E. Membrana plasmática.-**

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de ser alterados por los radicales libres. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad de la membrana, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares, todo ello provocado por la peroxidación lipídica, o la oxidación de importantes proteínas estructurales <sup>(17)</sup>.

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

en las cuales desempeñan un papel importante como señales intracelulares. <sup>(17)</sup>.

Cabe destacar la importancia de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos <sup>(17)</sup>.

#### **F. Enzimas solubles y proteínas.-**

Enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico <sup>(17)</sup>.

#### **G. Fagocitos activados.-**

Los fagocitos activados (neutrofilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  como uno de los mecanismos para matar microorganismos <sup>(17)</sup>.

#### **H. Otras enzimas.-**

Enzimas citosólicas solubles como la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa y enzimas unidos a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generan radicales libres durante su ciclo de catálisis <sup>(21)</sup>.

## 5. Oxidación.-

La oxidación es un cambio químico en el que un átomo o grupo de átomos pierden electrones o bien es la reacción en la que un átomo aumenta su número de oxidación (REACCIONES DE OXIDACION REDUCCION). Es importante saber que la vida misma, está llena de reacciones REDOX sucediendo a cada instante en el interior de nuestros cuerpos (APRENDE MAS SOBRE OXIDACION Y SUS EFECTOS).<sup>(34)</sup>

Existen otros procesos oxidativos importantes como lo es la combustión, la respiración y la fotosíntesis en las plantas, ya que a través de las reacciones que se llevan a cabo en ellos, se genera energía la cual es necesaria para que la vida exista. Sin embargo, en la respiración no sólo se obtiene energía, también se producen ciertas sustancias que son dañinas para el organismo. Estas sustancias dañinas son especies reactivas del oxígeno (EROs), es decir, son radicales libres o promueven la formación de los mismos. Es por esto que los radicales libres oxidan a las moléculas vecinas para así adquirir un equilibrio químico. Pero esas moléculas vecinas, al momento de ser oxidadas por los radicales libres, se convierten en especies radicalarias que van en busca de electrones de otras moléculas vecinas y es así como se genera una reacción en cadena capaz de destruir estructuras biológicas importantes.<sup>(31)</sup>

## 6. Estrés Oxidativo.-

El Estrés Oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismo antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura – función en cualquier órgano, sistema o grupo celular.<sup>(30)</sup>

## 6.1. Patología del Estrés Oxidativo.-

La acción de los radicales libres viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el radical libre. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del radical libre es a menudo la explicación de efectos a largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los radicales libres, pero las reacciones de los radicales libres provocan unos productos cuyo efecto es acumulativo. <sup>(30)</sup>

Los organismos posean unos mecanismos de defensa contra los radicales libres, los antioxidantes, sustancias que son capaces de retrasar o inhibir la oxidación de sustratos oxidables. El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado REDOX, determinando una “homeostasis REDOX” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación -reducción. <sup>(30)</sup>

Finalmente, el desequilibrio de este estado REDOX tiene unas consecuencias bioquímicas de forma que altera ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la “homeostasis REDOX”. <sup>(30)</sup>

### 6.1.1. Daño Oxidativo a las Proteínas.-

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren. Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los

radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica <sup>(30)</sup>

Otro mecanismo muy importante de oxidación de proteínas son los llamados “Sistemas de oxidación de función mixta” o “Sistemas de oxidación catalizada por metal”, que poseen como dianas más comunes los residuos de arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína. Estos sistemas catalizan una serie de reacciones acopladas, enzimáticas o no, que implican la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de Fe<sup>2+</sup> es la única función que tienen en común los sistemas de oxidación catalizada de metal. <sup>(30)</sup>

Los sistemas más relevantes son diversas NADH y NADPH oxidasas, xantina oxidasa y citocromo P450 reductasas.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas <sup>(30)</sup>

Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo. El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína <sup>(30)</sup>

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico, lo que se ve confirmado por ejemplo en para el caso de las hemoproteínas, como la oxihemoglobina, donde el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno

pueden reaccionar con el hierro para formar metahemoglobina y otros productos de oxidación. Otra importante hemoproteína, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido. <sup>(30)</sup>

### 6.1.2. Daño Oxidativo a los Lípidos.-

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación. El resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), el peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), el alcóxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) y el alquílico ( $\text{R}\cdot$ ). <sup>(30)</sup>

El proceso de ataque oxidativo a los lípidos, denominado peroxidación lipídica (LPO), comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico. Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el  $\text{O}_2$  y forma un radical peróxido,  $\text{R-COO}\cdot$ . Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquílico ( $\text{R}'\text{-CH}\cdot$ ) y un peróxido lipídico ( $\text{R-COOH}$ ), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria. Por lo que un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonal (HNN), e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y

producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas.  
(17)

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas. El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas <sup>(30)</sup>

### **6.1.3. Daño Oxidativo a los Glúcidos.-**

Los radicales libres atacan a los glúcidos de forma distinta. Los monos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares <sup>(30)</sup>

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos. <sup>(30)</sup>

Un caso especial es el del ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo radical superóxido) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980; Grootveld y cols, 1991). Se ha observado que la superóxido dismutasa es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico, en el líquido sinovial. <sup>(30)</sup>. Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar <sup>(30)</sup>.

Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo en la *diabetes mellitus*, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. Se postula que una anormal regulación en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo<sup>(30)</sup>.

#### 6.1.4. Daño Oxidativo al DNA.-

El DNA también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. Se sabe que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose radical peroxil. Las posteriores reacciones de estas especies radicalarias en el DNA dan lugar a un gran número de productos.<sup>(30)</sup>

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

orina. Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad <sup>(17)</sup>.

## 7. Los Estresores Exógenos.-

Los EROs (Especies Reactivas de Oxígeno) no sólo generan por la respiración. Existen miles de sustancias tóxicas en el ambiente que son fuente de radicales libres, por ejemplo, cuando el organismo se somete a la exposición de radiaciones UV, la contaminación ambiental, el exceso de ejercicio, ciertos fármacos, como el acetaminofeno, y el humo del cigarrillo, entre otros, son algunos de estresores exógenos a los que estamos expuestos <sup>(31)</sup>.

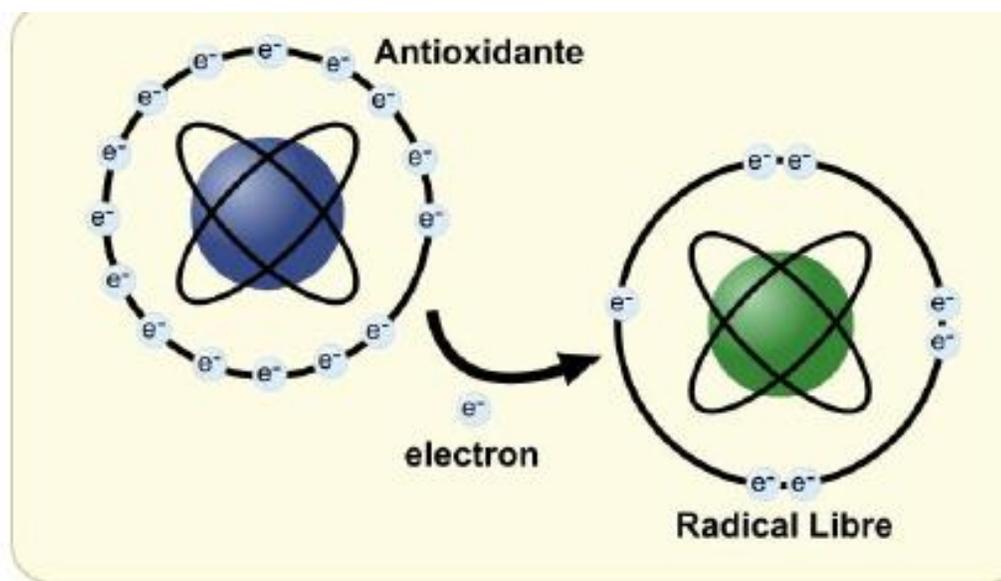
El ejercicio puede agotar la fuente de antioxidantes de los músculos y, algunas veces, de otros órganos, ya que incrementa el proceso oxidativo del cuerpo debido al requerimiento energético que se requiere. Esta energía es el ATP, para formar ATP, se requiere oxígeno, y esto al final resulta en una producción de especies reactivas del oxígeno <sup>(31)</sup>

Existen otros factores que alteran la concentración de los antioxidantes en los tejidos, estos son, entre otros, el daño por quemaduras o cirugías, así como por choque séptico y traumatismos. <sup>(31)</sup>

La intoxicación por metales, las infecciones bacterianas y virales, influyendo el VIH, así como el alcohol pueden generar estrés oxidativo <sup>(31)</sup>

## 8. Antioxidantes.-

Son sustancias que cuando están presentes retardan o inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de las EROs.



**FIGURA N° 1.4:** Antioxidantes estabilizan los radicales libres.

Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. (Fig.: 1.4). Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas. (RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES)

El organismo posee una serie de sistemas de naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres por él generados: se denominan antioxidantes. Halliwell en 1995 definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el

sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (16). Existen diferentes tipos de antioxidantes:

### 8.1. Antioxidantes Endógenos.-

Los Antioxidantes Endógenos previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical  $\text{OH}\cdot$  <sup>(17)</sup>

### 8.2. Antioxidantes Exógenos.-

Los Antioxidantes Exógenos son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, Alopurinol, bilirrubina y albúmina <sup>(16)</sup>.

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutatión	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Betacaroteno	Ácido Tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzima: Superóxidodismutasa (SOD) Catalasa Glutatión peroxidasa	Hierro
Licopeno		Selenio

**Tabla N° 1.1: Clasificación de los antioxidantes.**

## 9. Alopurinol.-

A nivel mundial los estudios básicamente señalan el efecto del Alopurinol en patologías asociadas con daños cardiovascular, con hipertensión, con hipercolesterolemia, hiperuricemia y como tratamiento de uveítis a nivel experimental.

La Xantina oxidasa una enzima que normalmente está presente en el endotelio y que cataliza la degradación de hipoxantina a ácido úrico, se caracteriza por producir, como bioproductos del metabolismo normal, gran cantidad superoxidos, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo, lo cual incrementa el daño endotelial en el paciente diabético, permitiendo la presencia de complicaciones. Esta enzima es inhibida por el Alopurinol evitando, de esta forma, la producción de radicales libres asociados con el daño endotelial que genera el desarrollo de complicaciones en el paciente con diabetes mellitus. <sup>(16)</sup>.

### 9.1. Composición Química.-

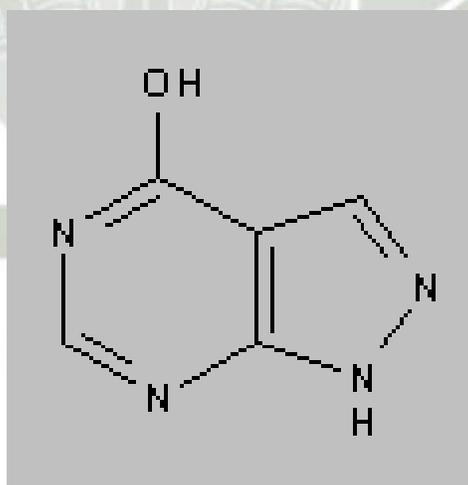


FIGURA N° 1.5:  $C_5H_4N_4O$ : 1H-Pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ol [315-30-0].

## 9.2. Caracteres generales.-

Polvo blanco o casi blanco, muy poco soluble en agua y en alcohol, prácticamente insoluble en éter y cloroformo. Soluble en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos. <sup>(15)</sup>

Peso Molecular: 136. 1

## 9.3. Propiedades Farmacológicas.-

### A. Mecanismo de Acción.-

El alopurinol actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. Reduce la producción de ácido úrico al inhibir las reacciones bioquímicas que conducen a su formación. El alopurinol es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina y actúa como un inhibidor de la xantina-oxidasa, la enzima responsable de la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico el producto final de catabolismo de las purinas en el hombre. En consecuencia. Ejerce una acción inhibitoria de la producción de radicales libres al impedir el paso de hipoxantina a xantina y anión superóxido. <sup>(16)</sup>

El alopurinol es metabolizado al oxipurinol que también es un inhibidor de la xantina oxidasa. <sup>(15)</sup>

Se ha comprobado que la reutilización de la xantina y de la hipoxantina para la síntesis de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos se mejora cuando sus oxidaciones son inhibidas por al alopurinol y oxipurinol. Esta reutilización no afecta el normal anabolismo de los ácidos nucleicos. Como resultado de la inhibición de la xantina oxidasa, en los pacientes tratados con alopurinol se han detectado unos niveles de xantina + hipoxantina de 0.3 a 0.4 mg/dl en

comparación con los niveles normales de aproximadamente 0.15 mg/dl. El valor máximo detectado, de 0.9 mg/dl de estas oxipurinas después de dosis muy altas de alopurinol están muy por encima de la saturación ( $> 7$  mg/dl).<sup>(15)</sup>

El aclaramiento renal de la hipoxantina y de la xantina es unas 10 veces mayor que el del ácido úrico. Los niveles urinarios más elevados de estos compuestos no están acompañados por problemas de nefrolitiasis. Solo ha habido tres informes de casos de formación de cristales por xantinas: en dos casos se trataba de pacientes con el síndrome de Lesh-Nyhan (caracterizado por una producción excesiva de ácido úrico por la carencia de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa. Esta enzima es necesaria para la conversión de la hipoxantina, la xantina y la guanina a sus respectivos nucleótidos). El tercer caso era un paciente con un linfosarcoma en el que se producían grandes cantidades de ácido úrico por la lisis de las células durante la quimioterapia.<sup>(15)</sup>

En el hígado se ha observado que, durante la isquemia-reperfusión, el alopurinol, además de su acción inhibidora sobre los radicales libres, produce un aumento en la síntesis de proteínas sin alterar la concentración de los nucleótidos energéticos. Tampoco interfiere con los valores hepáticos de glutatión durante la perfusión. El efecto beneficioso del alopurinol en la isquemia-reperfusión hepática, mediado por los radicales libres, también ha quedado demostrado por técnicas de quimioluminiscencia.<sup>(15)</sup>

#### **B. Farmacocinética:**

El alopurinol se absorbe en un 90% en el tracto digestivo. Los niveles plasmáticos son máximos aproximadamente a las 1.5 y -4.5 horas para

el alopurinol y el oxipurinol, respectivamente. Después de una dosis única de 300 mg los niveles máximos alcanzados son de 3 g/ml de alopurinol y de 6.5 g/ml de oxipurinol. Aproximadamente el 20% del alopurinol ingerido se excreta en las heces. <sup>(16)</sup>

Debido a su rápida oxidación a oxipurinol y a un aclaramiento renal igual a su filtración glomerular, la vida media plasmática del alopurinol es de 1.5 horas. El oxipurinol tiene una semivida más larga (unas 15 horas). Mientras que el alopurinol es eliminado por filtración glomerular, el oxipurinol se reabsorbe por los túbulos renales de una forma similar a como lo hace el ácido úrico. El aclaramiento del oxipurinol es aumentado por los fármacos uricosúricos y, en consecuencia, la asociación de un uricosúrico al alopurinol reduce los efectos de este sobre la xantina oxidasa y aumenta la excreción de ácido úrico en la orina. <sup>(16)</sup>

En la práctica clínica el efecto neto de una asociación de alopurinol con un agente uricosúrico puede ser beneficiosa en algunos pacientes siempre y cuando no exceda la capacidad funcional renal para eliminar el ácido úrico. La hiperuricemia puede ser primaria, como en la gota, o secundaria a una condición grave como la leucemia, policitemia vera, mieloma múltiple o psoriasis. También puede producirse durante los tratamientos con diuréticos, diálisis renal, lesiones renales o dietas salvajes. La hiperuricemia asintomática no es una indicación para el tratamiento con alopurinol. <sup>(16)</sup>

### **C. Indicaciones Terapéuticas.-**

Se utiliza para reducir las concentraciones de urato en los líquidos corporales y/o en la orina para prevenir o eliminar los depósitos de ácido úrico y uratos, así como para el tratamiento de las principales

manifestaciones clínicas de depósito de ácido úrico. Estas manifestaciones son artritis gotosa, tofos cutáneos y afección renal con depósito de cristales o formación de cálculos. <sup>(16)</sup>

Dichas manifestaciones se producen en:

- Artritis gotosa crónica primaria o secundaria. Gota idiopática. (CAF DIGEMID)
- Profilaxis y tratamiento de hiperuricemia (secundaria a discrasias sanguíneas o lisis de tumores provocados por quimioterapia. Litiasis por ácido úrico. (CAF DIGEMID)
- Nefropatía inducida por ácido úrico. (CAF DIGEMID)
- Enfermedad neoplásica y mielo proliferativa con alta frecuencia de recambio celular, en las que se producen altos niveles de urato, tanto espontáneamente como después de un tratamiento citotóxico. (CAF DIGEMID)
- Alteraciones enzimáticas que llevan a la sobreproducción de urato, que incluyen: Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, incluyendo el síndrome de Lesch-Nyhan. Glucosa-6-fosfatasa, incluyendo enfermedad de almacenamiento de glucógeno. Fosforribosilpirofosfato sintetasa. Fosforribosilpirofosfato amidotransferasa. Adenina fosforribosiltransferasa. Glutación reductasa. Glutamato deshidrogenasa.
- Para el tratamiento de los cálculos renales de 2-hidroxiadenina, relacionados con una actividad deficiente de adenina fosforribosiltransferasa.
- Para el tratamiento de litiasis renal mixta recurrente de oxalato cálcico, en presencia de hiperuricosuria, cuando han fallado medidas tales como la dieta, ingesta de líquidos u otras medidas terapéuticas.

#### 9.4. Reacciones Adversas.-

La incidencia es mayor en presencia de alteración renal y/o hepática.

##### A. **Reacciones cutáneas.-**

Son las más comunes y pueden aparecer en cualquier momento del tratamiento. Estas reacciones pueden ser prurito, maculo-pápulas, a veces aparece descamación, otras veces aparición de lesiones purpúricas, raramente, exfoliación. El tratamiento con alopurinol deberá interrumpirse si se producen tales reacciones. <sup>(16)</sup>

##### B. **Hipersensibilidad generalizada.-**

Raramente se han producido reacciones cutáneas asociadas con exfoliación, fiebre, linfadenopatía, artralgia y/o eosinofilia que se asemejan al síndrome de Stevens-Johnson y/o al de Lyell. La vasculitis asociada a alopurinol y la respuesta tisular se pueden manifestar de formas diversas incluyendo hepatitis, nefritis intersticial y más raramente, epilepsia. Cuando se presentan reacciones de hipersensibilidad generalizadas, por lo general se producen también una alteración renal o hepática particularmente cuando estas reacciones tienen una consecuencia fatal. <sup>(16)</sup>

##### C. **Linfadenopatía angioinmunoblástica:**

Raramente se ha descrito linfadenopatía angioinmunoblástica tras la biopsia de una linfadenopatía generalizada. Parece ser reversible tras la interrupción del tratamiento con alopurinol. <sup>(16)</sup>

D. Hepatitis granulomatosa: Muy raramente se ha descrito la presencia de hepatitis granulomatosa, sin evidencia obvia de una hipersensibilidad

más generalizada. Parece ser reversible tras la interrupción del alopurinol. <sup>(16)</sup>

**E.** Alteraciones gastrointestinales: Se registraron náuseas y vómitos. Se pueden evitar tomando el alopurinol tras las comidas. Tanto la hematemesis recurrente como la ateatorrea han sido consideradas como efectos adversos muy raros. <sup>(16)</sup>

**F.** Sangre y sistema linfático: Existen informes ocasionales de trombocitopenia, agranulocitosis y anemia aplásica, particularmente en individuos con la función renal alterada remarcando la necesidad de precaución especial en este grupo de pacientes. <sup>(16)</sup>

**G.** Varias: Se ha registrado las siguientes reacciones ocasionalmente: fiebre, malestar general, astenia, cefalea, vértigo, ataxia, somnolencia, coma, depresión, parálisis, parestesia, neuropatía, alteraciones visuales, cataratas, cambios maculares, cambio de gusto, estomatitis, cambios en los hábitos intestinales, infertilidad, impotencia, emisión nocturna, diabetes mellitus, hiperlipemia, forunculosis, alopecia, decoloración del cabello, angina, hipertensión, bradicardia, edema, uremia, hematuria y ginecomastia. <sup>(16)</sup>

#### 9.5. Interacciones Farmacológicas.-

**A. 6 – Mercaptopurina y Azatioprina.-**

Cuando se administran por vía oral concomitantemente con alopurinol, solo se debe administrar la cuarta parte de la dosis de 6 – Mercaptopurina o Azatioprina, ya que la inhibición de la xantina oxidasa prolongará su actividad. <sup>(9)</sup>

**B. Arabinosido de adenina.-**

La semivida plasmática de arabinosido de adenina aumenta en presencia de alopurinol. Vigilar más, para reconocer los efectos tóxicos aumentados. <sup>(9)</sup>

**C. Salicilato y agentes uricosúricos.-**

Oxipurinol, principal metabolito de alopurinol y activo por si mismo, se excreta por vía renal de forma similar a los uratos. Por ello, los fármacos con actividad uricosúrica como probenocid, o dosis altas de salicilatos, pueden acelerar la excreción de oxipurinol. Esto puede disminuir la actividad terapéutica de alopurinol. <sup>(9)</sup>

**D. Clorpropamida.-**

Si se administra alopurinol concomitantemente con clorpropamida cuando la función renal es escasa, puede haber un riesgo aumentado de actividad hipoglucémica prolongada. <sup>(9)</sup>

**E. Anticoagulante cumarínicos.-**

No hay evidencia de interacciones. Sin embargo, todos los pacientes que estén en tratamiento con anticoagulantes se deberán controlar cuidadosamente. <sup>(9)</sup>

**F. Fenitoina.-**

Alopurinol puede inhibir la oxidación hepática de fenitoina, pero no se ha demostrado la significación clínica de esto. <sup>(9)</sup>

**G. Teofilina.-**

Se ha reportado inhibición de metabolismo de la teofilina, debido a que la xantina oxidasa interviene en su biotransformación. Los niveles

de teofilina deberían ser monitoreados en los pacientes que comienzan o incrementan la terapia con alopurinol. <sup>(9)</sup>

#### **H. Ciclosporina.-**

Los reportes sugieren que las concentraciones plasmáticas ciclosporina, pueden ser incrementados durante el tratamiento combinado con alopurinol. La posibilidad de la toxicidad con la co-administración deberá ser considerada. <sup>(9)</sup>

#### **I. Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Bleomicina.-**

Se ha reportado entre los pacientes con enfermedad neoplásica (con excepción de leucemia), un aumento en la función de la supresión de la médula ósea, causado por la ciclofosfamida y otros agentes citotóxicos, en presencia de alopurinol. Sin embargo, en estudio controlado con pacientes tratados con ciclofosfamida, doxorrubicina y bleomicina, el alopurinol con provoco un aumento en la reacción toxica de estos agentes. <sup>(9)</sup>

#### **J. Ampicilina, Amoxicilina.-**

El incremento en la frecuencia de rash cutáneo ha sido reportado en pacientes que reciben ampicilina o amoxicilina concomitantemente con alopurinol, comparado con pacientes que reciben esta combinación. La causa que reporta esta asociación no ha sido establecida, por lo tanto se recomienda la utilización de un antibiótico alternativo a la ampicilina o a la amoxicilina en aquellos pacientes que reciban alopurinol. <sup>(9)</sup>

## 10. Diabetes.-

### Disfunción Endotelial y Diabetes.-

La diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente en el mundo. El riesgo cardiovascular asociado a la diabetes comienza años antes de su diagnóstico. Se postula que, tanto la diabetes como la aterotrombosis, tienen un nexo etiopatogénico común<sup>23</sup> que se iniciaría por incremento del estrés oxidativo intracelular, seguido de activación de células inflamatorias<sup>24</sup>. Dichos cambios producirían disfunción de las células  $\beta$  del páncreas y resistencia a la insulina en individuos más predispuestos genéticamente y, de forma paralela, el estrés oxidativo generará disfunción endotelial sistémica.<sup>(6)</sup>

Se ha observado que la disfunción de las células  $\beta$  ocurre tras exposición a niveles elevados de glucemia y ácidos grasos libres, especialmente en fase postprandial. Recientemente se ha demostrado que concentraciones elevadas de glucosa aumentan los radicales libres intramitocondriales, disminuyendo la primera fase de la secreción de insulina, al menos en parte, a través de la supresión de actividad del enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Los ácidos grasos libres aumentan asimismo, la generación de radicales libres y, junto a niveles elevados de glucosa, producen a largo plazo daño pancreático. Las células  $\beta$  son muy sensibles al estrés oxidativo por su bajo contenido en enzimas antioxidantes. El estrés oxidativo modifica directamente el fenotipo en las células endoteliales incrementando la expresión génica de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, introduciendo el concepto etiopatogénico de inflamación crónica de bajo grado<sup>30</sup>, la cual también contribuye al mecanismo patogénico de resistencia a la insulina y aparición de la diabetes mellitus tipo 2.<sup>(6)</sup>

La hiperglucemia intracelular puede ocasionar disfunción endotelial a través de varios mecanismos: en primer lugar, por incremento de la síntesis de sorbitol y fructosa por acción de la aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa, procesos acompañados de

oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> y reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH<sup>37</sup>. Se produce también alteración de las vías de señalización intracelular, como activación de la proteína cinasa C y sus múltiples consecuencias: síntesis de VEGF, disminución de la actividad de la sintetasa de NO o aumento de endotelina-1, e inhibición de la fosforilación de la proteína cinasa akt, y con ello disminución de la disponibilidad de NO. En tercer lugar, se produce aumento de hexosamina-6-fosfato y, secundariamente, N-acetilglucosamina, con el consiguiente aumento de actividad del factor de transcripción SP-1, que aumenta la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y factor transformador de crecimiento  $\beta 1$  (TGF-  $\beta 1$ ) <sup>(6)</sup>



## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1.1. Tipo de Estudio.-

El presente estudio es de tipo experimental y de tipo Prospectiva

#### 1.2. Lugar de Experimentación.-

El presente Trabajo de Investigación se realizó en el Bioterio y en los Laboratorios H-103, H104 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María de Arequipa, en los cuales se realizó la preparación de los reactivos a utilizar.

Los registros de vasodilatación se realizaron empleando una Microcámara para órgano aislado en el Centro de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín.

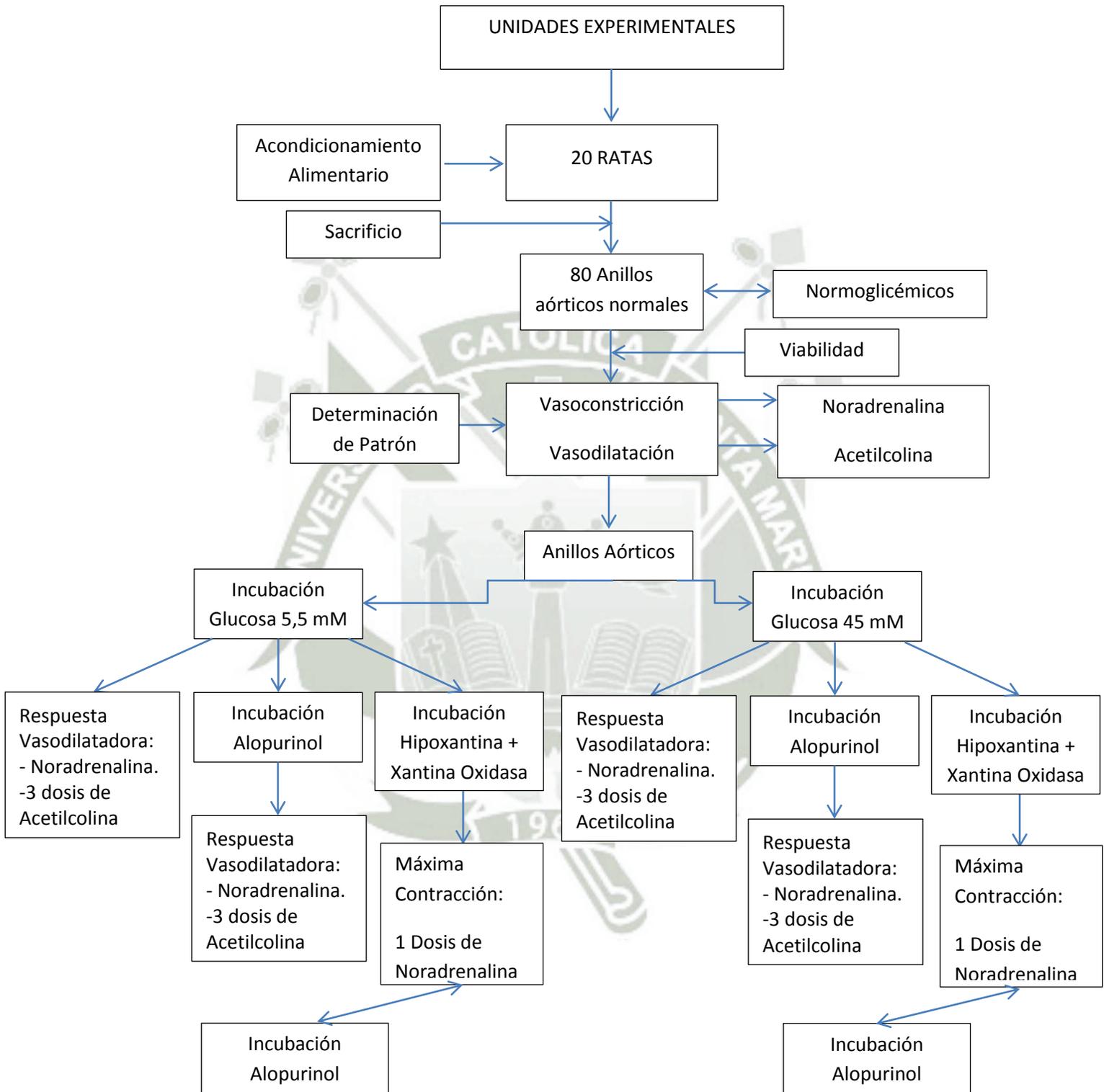
#### 1.3. Muestra Biológica.-

Como animales de experimentación se utilizaron 20 ratas albinas de ambos sexos, de la especie Wistar, raza Rattus Novergicus, de  $280 \pm 20$ g de peso, provenientes del Bioterio de la UCSM; las cuales fueron mantenidas en condiciones adecuadas, permitiéndoles libre acceso al agua y a la comida.

#### 1.4. Unidades de Estudio.-

Las unidades de estudio estará constituida por anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicemicas y con hiperglicemia aguda las cuales serán distribuidos aleatoriamente según el protocolo de estudio.

**1.5. Diagrama de Flujo de Diseño Experimental.-**



**FIGURA N° 2.1:Diagrama de Flujo del Diseño Experimental**

## 1. MATERIALES Y REACTIVOS.-

### 1.1. Material de Vidrio.-

- Matraz kitasato de 500ml
- Probetas graduadas 10ml
- Pipetas pasteur
- Vasos precipitados de 50ml,100ml

### 1.2. Equipos.-

- Balanza analítica: Sartorius Verke, serie 241.
- Agitador magnético/plancha térmica marca Lab-Line
- pHmetro digital marca Meter
- Osmómetro marca Somete
- Tensiómetro marca Citizen para registrar PAS y PAD y FC
- Cámara de órganos aislados para anillos de aorta, termorregulado mediante circuito de agua externo.
- Balón de oxígeno
- Polígrafo Marca Grass Instrument. De 10 canales
- Transductor isométrico Marca Grass Inst.

### 1.3. Reactivos.-

- **Norepinefrina**, 489350. L – (-) – Norepinephrine – (+) – bitartrate, Noradrenalina. 100mg. MERCK.
- **Acetilcolina**, 841870. Acetilcolina yoduro. 25 g. MERCK.
- **Glucosa**, 1281608. D – (+) – Glucose solution. 100g/L in H<sub>2</sub>O, sterile – filtered, BioXtra, suitable for cell culture. SIGMA – ALDRICH.
- **Xantino oxidasa**, X4376 SIGMA. Xanthine Oxidase from bovine milk. Lyophilized powder, 0,4 – 1,0 units/mg protein. SIGMA – ALDRICH.
- **Hipoxantina**, H9377 SIGMA. 6 – Hydroxypurine. Hypoxanthine  $\geq$  99.0%. SIGMA – ALDRICH.

- **Alopurinol**, Frasco por 5,25g. A 8003 SIGMA.
- **Solución Krebs-Henseleit (KH)**; conteniendo en mM: NaCl 119, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,17,  $\text{CaCl}_2$  2,5,  $\text{NaHCO}_3$  25, D-glucosa 5,5 y EDTA 0,026).

## 2. METODOS.-

### 2.1. Técnica de obtención de los anillos aórticos de ratas.-

Para la obtención de los anillos, se sacrificaron los animales mediante contusión cervical, por ser su muerte súbita y por consiguiente menos traumática. Un segmento de aorta torácica fue rápidamente removido y cuidadosamente disecado en una cápsula petri conteniendo solución Krebs-Henseleit (KH) a  $4^\circ\text{C}$ . Se procedió luego a su limpieza cuidadosa, eliminando la adventicia y el tejido conectivo periaórtico para proceder a seccionarla en anillos de  $4,0 \pm 0,05\text{mm}$  de longitud, mediante una guillotina múltiple diseñada para tal fin, extrayéndose al final 4 anillos de cada segmento.

### 2.2. Inserción de los anillos aislados en la cámara de órganos aislados.-

Uno a uno, los anillos fueron insertados dentro del pozo de la cámara de órganos aislados para su estudio, sujetándolos entre dos ganchos de acero inoxidable. Uno de ellos, fijo a manera de poste en el borde interno de la cámara y el otro, constituido por el extremo terminal de un transductor de tensión conectado a un polígrafo Grass con su aguja inscriptora. Se llenó el pozo de la cámara con 30ml de KH mantenida con burbujeo continuo de una mezcla carbógena de gases (95% de  $\text{O}_2$  más 5% de  $\text{CO}_2$ ). La temperatura de la solución en la cámara fue de  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , gracias al empleo de un termociclador con circulación de agua continua. A continuación se dejó reposar la preparación durante 40 minutos aproximadamente, esperando su estabilización para lo cual se cambió hasta en 3 oportunidades la solución Krebs-Henseleit (KH).

Una vez estabilizada la preparación, lo cual se conoce porque deja de oscilar la aguja registradora del polígrafo, se procedió a administrar al baño de la cámara de órganos aislados, las drogas en estudio tal y como se reseña en el protocolo.

Tanto las contracciones como las relajaciones inducidas en los anillos aórticos, se expresan en porcentaje con respecto a la máxima contracción obtenida con la solución de norepinefrina (100%), La relajación obtenida con la mayor dosis de acetilcolina servirá de patrón comparativo.

### **2.3. Protocolo de administración de los fármacos en estudio.-**

- A.** Para obtener la respuesta patrón de vasoconstricción, se añadió al baño una solución de norepinefrina  $5\mu\text{M}$  obteniéndose en cada anillo normoglucémico, su máxima respuesta considerándola arbitrariamente como del 100%.
- B.** Seguidamente, una vez que se mantiene estable la máxima contracción, se administró al baño tres dosis crecientes de acetilcolina para evaluar el efecto dosis respuesta. Las tres soluciones ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M) de ACh se administraron una a continuación de la otra manteniendo un intervalo de 5 min entre ellas.
- C.** A los porcentajes de relajación obtenidos con cada dosis de ACh respecto a la máxima contracción (100%), se los consideró para efectos comparativos, como las respuestas patrón.
- D.** Terminado el protocolo, se extrae el anillo de los soportes de la cámara, previo lavado por 15 minutos con solución KH, se procedió a incubarlo ya sea en una solución con glucosa normal (5,5mM) o en una solución suprafisiológica de glucosa (45mM). Esta última con la

finalidad de conseguir anillos con hiperglucemia aguda que simula un estado de diabetes mellitus.

#### **2.4. Obtención de la respuesta con dosis suprafiológica de glucosa.-**

Obtenidos los patrones de relajación, se procedió a repetir todo el procedimiento anterior con los anillos de aorta torácica incubados durante 4 horas en ambas soluciones de glucosa (5,5mM y 45mM). Para lo cual, se extrajo el anillo del medio de incubación y se lo insertó en la cámara de órgano repitiéndose los pasos 1 y 2 anteriores.

#### **2.5. Efecto del tratamiento antioxidante del alopurinol sobre el deterioro de la vasodilatación de anillos de aorta aislados con hiperglucemia aguda.-**

Una vez obtenida las respuestas de cada anillo a las tres dosis de ACh, se extrajo el anillo de los soportes y se los somete a una segunda incubación sumergiéndolos en un medio conteniendo alopurinol  $10^{-4}$ M durante 20 minutos. Cumplido el tiempo, se vuelve a instalar el anillo en la cámara de órganos repitiéndose nuevamente los pasos 1 y 2 del protocolo.

Era de esperar que con cada anillo se lograra llevar a cabo todos los pasos anteriores. Sin embargo, ello no fue posible completamente por lo que algunos anillos solo permitieron realizar algunos pasos.

Tanto la NA como la ACh fueron disueltas en agua destilada. Las soluciones se prepararon con la molalidad adecuada, considerando su dilución en la solución presente en la cámara de tal manera, que por cada 100 $\mu$ l que se agregó al baño al disolverse en los 750 $\mu$ l de KH, se obtenga la concentración molar señalada en el protocolo.

## **2.6. Efecto sobre el incremento de radicales libres (acción antioxidante) del alopurinol observada a través de la vasoconstricción inducida con NA.-**

Un grupo de anillos una vez obtenida su contracción patrón y su relajación con las tres dosis de ACh, fueron expuestos (incubados) en un medio donde se estaban generando radicales libres de oxígeno resultado de la oxidación enzimática del sustrato hypoxantina convirtiéndose a ácido úrico por acción de la xantina oxidasa ambos presentes en el medio de incubación.

Para tal fin, se instaló en los soportes de la cámara de órganos aislados, anillos preincubados con hypoxantina y xantina oxidasa procediéndose luego a inducirles vasoconstricción con NA  $10^{-5}$ M. Una vez obtenida la máxima respuesta, se los extrajo de la cámara y se los incubó en una solución de alopurinol  $10^{-4}$ M durante 20 minutos. Procediéndose al cabo del tiempo a repetir la inducción de vasoconstricción con NA.

Para el procedimiento anterior, primero se incubaba los anillos con la solución de hypoxantina  $10^{-4}$ M, luego de transcurridos 10 min se añade al medio 0,1U/ml de xantina oxidasa.

Las soluciones de hypoxantina y de alopurinol son previamente alcalinizadas para su conservación con una solución 0,5N de NaCl.

## **2.7. Análisis Estadístico.-**

Para la evaluación de los efectos se realizaron empleando el paquete estadístico SigmatStat para Windows versión 2.03 (SPSS Inc.)

Se calcularon los siguientes estadígrafos:

- T de Students para hallar la diferencia entre dos medias independientes

- Para el efecto del tratamiento se realizará el Análisis de Varianza Simple (ANDEVA).
- La Prueba de Tukey permitirá determinar la efectividad del tratamiento en el tiempo.

Las diferencias se consideraron como:

- No significativas  $p > 0,05$
- Significativas  $p < 0,05$
- Altamente significativas  $p < 0,01$



### CAPITULO III

#### RESULTADOS

La presente sección presenta los resultados experimentales de los diferentes grupos de trabajo bajo las diversas condiciones estudiadas. Tanto las tablas como los gráficos se estructuraron en base a las frecuencias individuales encontradas para cada dosis de acetilcolina.

Cada una de las tablas presenta para cada tiempo, el valor en porcentaje, después de haber promediado tres (3) respuestas, el efecto vasoconstrictor o vasodilatador. Así mismo, se incluye el análisis estadístico respectivo con el grado de significancia encontrada, resultado del test de especificidad de Tukey modificado, ajustándose todos los datos a un valor de probabilidad igual o mayor del 99%.

El **CUADRO N° 3.1** con su respectiva figura (FIGURA N° 3.1), nos muestra los patrones obtenidos tanto para la contracción (100%) con la solución de noradrenalina  $5\mu\text{M}$  y los patrones normales de relajación con 3 dosis crecientes de acetilcolina sobre los anillos de aorta aislada de rata a través del tiempo.

Haciendo el análisis del CUADRO N° 3.1 Y FIGURA 3.1, observamos que la contracción máxima se alcanzó a partir del minuto 3,5 por lo que 30 segundos después, se añadió al baño de órganos la 1ra dosis de ACh ( $0,1\mu\text{M}$ ) observándose una relajación aproximadamente del 15%. Con la 2da dosis aplicada al minuto 5,5 con 30 seg, se obtuvo una relajación del orden del 33% mientras, con la 3ra dosis ( $10\mu\text{M}$  de ACh) la relajación fue del 81%.

Estos valores de relajación servirán de patrón para compararlos con los resultados obtenidos con la incubación con alopurinol en las FIGURAS: 3.2, 3.3 y 3.4.

**CUADRO N° 3.1.-**

**Obtención del patrón de contracción y relajación fisiológicos de anillos aórticos de ratas normales (Grupo Control) en respuesta a la administración de noradrenalina (1 $\mu$ M) y acetilcolina (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) respectivamente.**

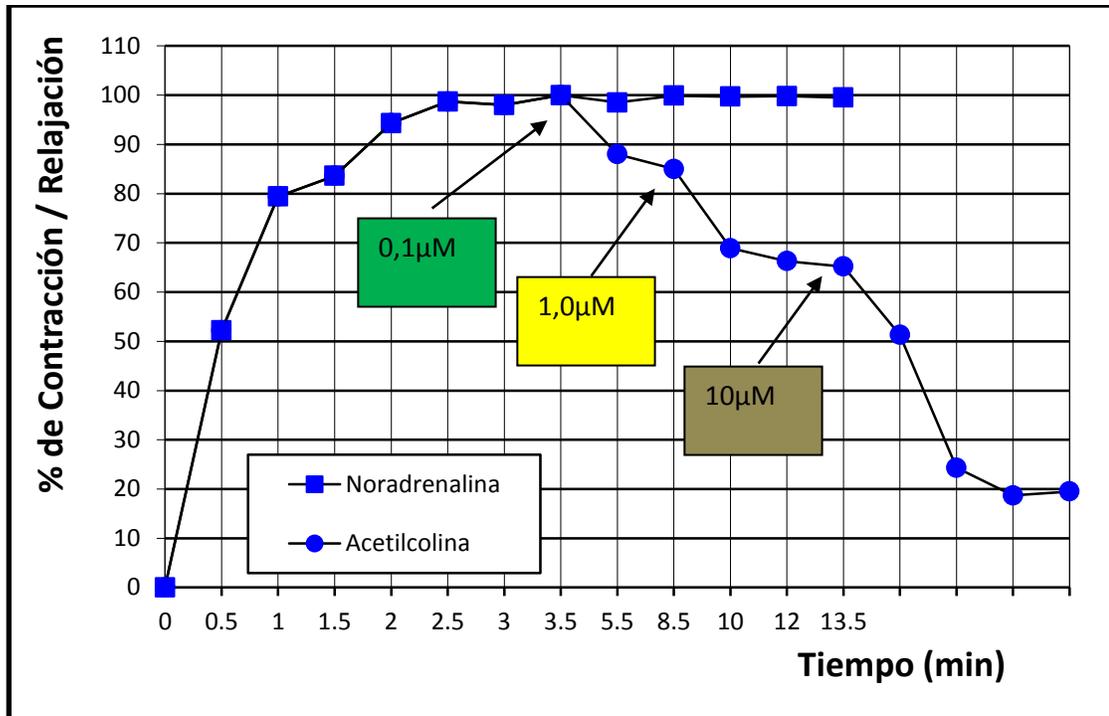
Tiempo (min)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	5,5	8,5	10	12	13,5
<b>Noradrenalina</b>	0	52,2	79,4	83,6	94,3	98,7	98,0	100,0	98,5	99,9	99,7	99,8	99,5
$\pm$ ES	0	5,4	4,7	6,5	6,8	5,9	5,6	6,1	6,4	5,8	7,2	6,7	6,4

Dosis de acetilcolina	0,1 $\mu$ M			1,0 $\mu$ M				10 $\mu$ M			ANDEVA	
	100*	88,6	88,2	85,0	68,9	66,3	65,2	51,3	24,3	18,7		19,5
<b>Acetilcolina</b>	100*	88,6	88,2	85,0	68,9	66,3	65,2	51,3	24,3	18,7	19,5	<b>P&lt;0,01*</b>
$\pm$ ES	6,1	7,2	6,6	7,5	6,8	5,9	4,7	3,8	3,1	1,8	1,1	

- Los resultados se expresan como porcentaje (Media  $\pm$  error estándar, ES).
- Se consideró como del 100% a la máxima contracción desarrollada por el músculo liso de los anillos aórticos normotensos en respuesta a la solución de noradrenalina.
- Las flechas indican el momento de la administración de cada dosis de acetilcolina.
- Se aplicó análisis de varianza (ANDEVA) y el test de especificidad de Tukey modificado para determinar las diferencias significativas con una exigencia del 99%.
- n, tamaño de la muestra (6 anillos).

**FIGURA 3.1**

Obtención del patrón de contracción y relajación fisiológicos de anillos aórticos de ratas normales (Grupo Control) en respuesta a la administración de noradrenalina ( $1\mu\text{M}$ ) y acetilcolina ( $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) respectivamente.



**CUADRO N° 3.2.-**

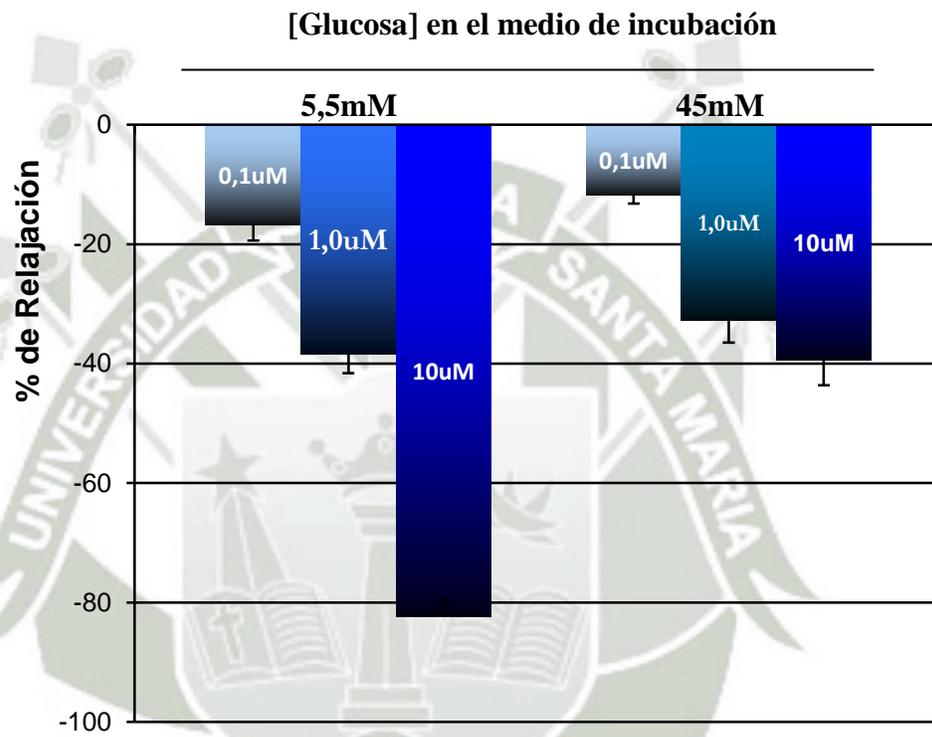
**Respuesta vasoactiva de anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicémicas preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa a dosis crecientes de acetilcolina (0,1  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M y 10 $\mu$ M).**

Concentración de ACh	Concentración de glucosa		Prueba t
	5,5mM	45mM	
<b>0,1<math>\mu</math>M</b> <b>X <math>\pm</math> ES</b>	16,7 $\pm$ 1,5	11,7 $\pm$ 1,7	P<0,05
<b>1,0<math>\mu</math>M</b> <b>X <math>\pm</math> ES</b>	38,4 $\pm$ 2,2	32,8 $\pm$ 3,6	P<0,05
<b>10<math>\mu</math>M</b> <b>X <math>\pm</math> ES</b>	82,3 $\pm$ 4,1	39,4 $\pm$ 3,9	P<0,01
<b>N</b>	5	5	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación  $\pm$  el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con noradrenalina.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

**FIGURA 3.2**

**Respuesta vasoactiva de anillos aislados de aorta torácica de ratas normoglicémicas preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa a dosis crecientes de acetilcolina (0,1  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M y 10 $\mu$ M).**



**CUADRO N° 3.3.-**

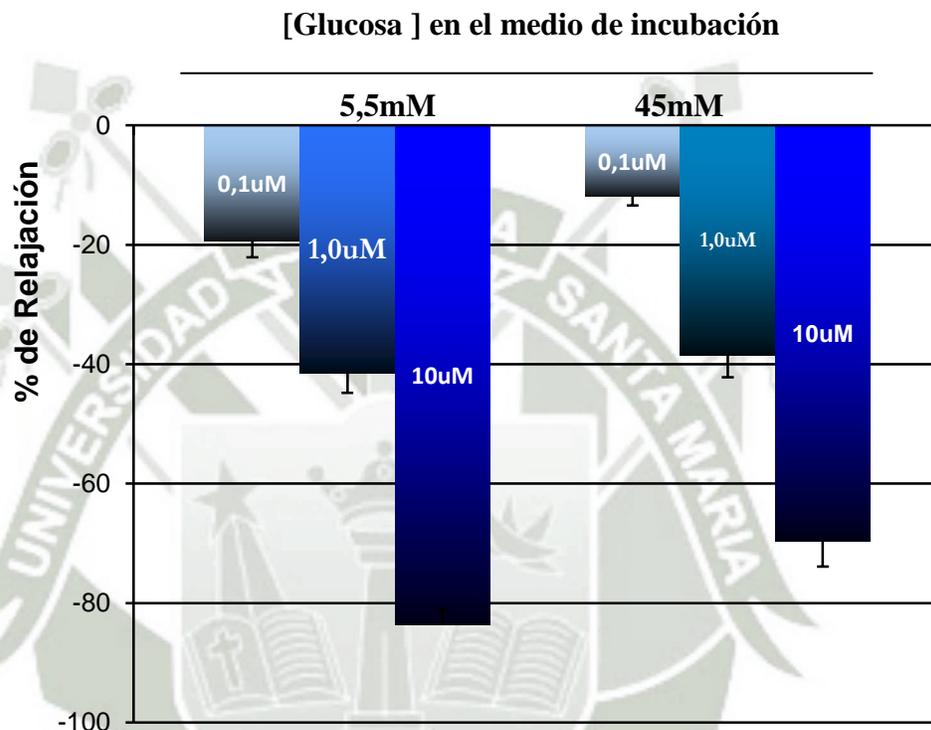
**Efecto del tratamiento con alopurinol sobre la respuesta vasoactiva de ratas con hiperglucemia aguda (preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa) a tres dosis crecientes de acetilcolina (0,1  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M y 10 $\mu$ M).**

Concentración de ACh	Concentración de glucosa		Prueba t
	5,5mM	45mM	
<b>0,1<math>\mu</math>M</b>	19,4	11,9	P<0,05
<b>X <math>\pm</math> ES</b>	$\pm 1,2$	$\pm 0,9$	
<b>1,0<math>\mu</math>M</b>	41,6	38,5	P<0,05
<b>X <math>\pm</math> ES</b>	$\pm 3,0$	$\pm 2,3$	
<b>10<math>\mu</math>M</b>	83,7	69,7	P<0,01
<b>X <math>\pm</math> ES</b>	$\pm 3,6$	$\pm 4,8$	
<b>N</b>	5	5	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación  $\pm$  el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con noradrenalina.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

**FIGURA 3.3**

**Efecto del tratamiento con alopurinol sobre la respuesta vasoactiva de ratas con hiperglucemia aguda (preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa) a tres dosis crecientes de acetilcolina (0,1  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M y 10 $\mu$ M).**



**CUADRO N° 3.4.-**

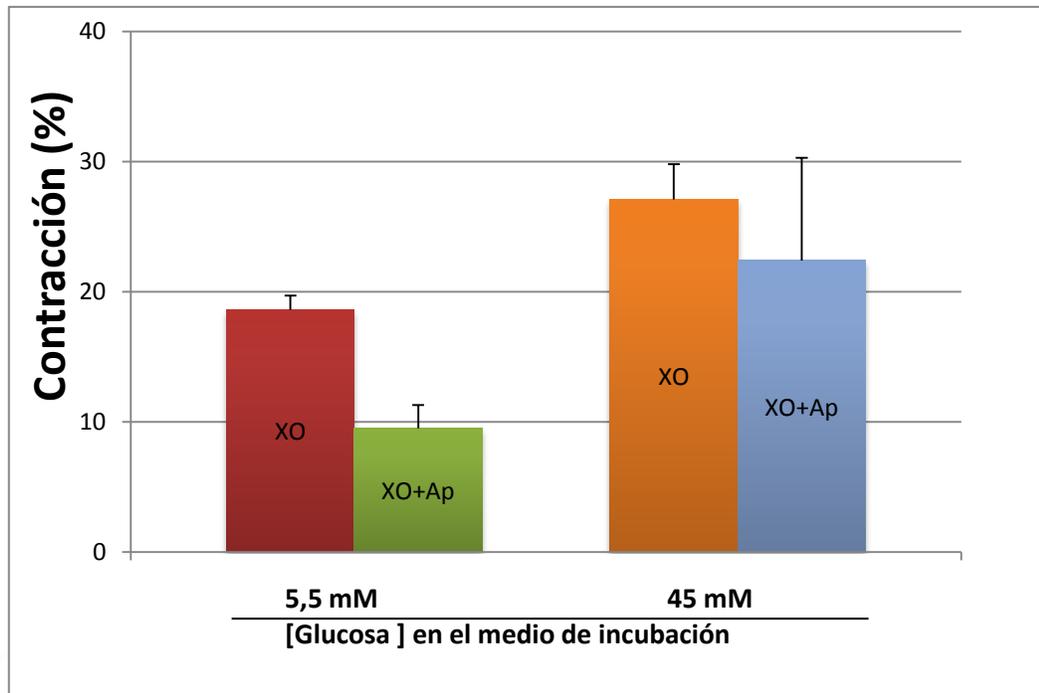
**Efecto de la administración de xantina oxidasa en presencia de hipoxantina sobre la actividad de la musculatura lisa de anillos aislados de aorta torácica de ratas preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa.**

	Concentración de glucosa		Prueba t
	5,5mM	45mM	
<b>Xantina oxidasa 0,1U/ml X ± ES</b>	20,8 ± 1,5	29,6 ± 1,9	P<0,05
<b>Xantina oxidasa + alopurinol X ± ES</b>	11,7 ± 1,1	24,5 ± 3,2	P=0,05
<b>N</b>	5	5	

- Los promedios se expresan en porcentaje de contracción con respecto a la noradrenalina (100%) ± el error estándar (ES).
- Tanto la concentración de hipoxantina como de alopurinol fueron de  $10^{-4}$ M
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

**FIGURA 3.4.**

**Efecto de la administración de xantina oxidasa en presencia de hipoxantina sobre la actividad de la musculatura lisa de anillos aislados de aorta torácica de ratas preincubadas con 5,5 y 45mM de glucosa.**



Por su parte, el CUADRO 3.2 y la FIGURA 3.2 nos muestran los resultados de incubar previamente los anillos aórticos con una solución fisiológica de glucosa (5,5mM) y luego con una hiperglucémica (45mM) durante 20 minutos. El cuadro con su respectiva figura demuestran que resultado de la incubación con la solución normal de glucosa, los porcentajes de relajación obtenida son similares a los encontrados en la figura anterior, no encontrándose en consecuencia diferencias significativas entre las dosis.

Pero cuando se incubaron los anillos en la solución hiperglucemiante, al añadir al baño de órganos las soluciones crecientes de acetilcolina, sí se manifestó un detrimento en la relajación vascular. Las 2 primeras dosis de ACh no lograron relajar la musculatura lisa de los anillos aórticos en la magnitud que lo hicieron con anillos normales. El porcentaje de relajación para las dos primeras dosis descendió significativamente ( $p < 0,05$ ) mientras que con la dosis mayor de  $10\mu\text{M}$  de ACh añadida al baño, la inhibición de la relajación resultado de la incubación de los anillos en la solución hiperglicémica fue altamente significativa con respecto al patrón normal. De 82.3 descendió a 39.4.

El tratamiento con alopurinol como antioxidante, sobre los anillos preincubados con la solución hiperglucémica incrementó la vasodilatación significativamente en comparación con los anillos no tratados con alopurinol.

## DISCUSIÓN

La diabetes mellitus disminuye la relajación de los vasos sanguíneos al ser expuestos a acetilcolina. De la misma manera, en el presente trabajo hemos demostrado que la exposición a elevadas concentraciones de glucosa in vitro, causan en forma selectiva disminución de la relajación dependiente del endotelio. Estos resultados nos llevan a proponer que la elevada glucosa per se, sería la causa primaria responsable de la disfunción endotelial observada en la diabetes mellitus.

El alopurinol, un inhibidor específico de la xantina oxidasa y a la vez barredor de radicales libres previno el efecto de la exposición de los anillos aórticos a altos niveles de glucosa. Por lo que consideramos que la presencia de radicales libres es la responsable de la disfunción inducida por la glucosa.

Varios estudios señalan que la presencia de radicales libres estarían involucrados en la patogénesis de la diabetes ya que empleando antioxidantes como la Vit. E, SOD, catalasa y ácido ascórbico, mejora el cuadro diabético. (31)

De otro lado, nuestros resultados también señalan que los EROs generados por la xantina oxidasa en presencia de hipoxantina, provocaron vasoconstricción siendo esta aún mayor en presencia de altos niveles de glucosa. El hecho que el alopurinol inhiba las contracciones inducidas por la xantina oxidasa sugiere la participación de algún metabolito producto de la reacción en la contracción.

El incremento de la vasoconstricción debida al anión superóxido en la condición de glucosa elevada podría significar una alteración de los mecanismos protectores presentes en las célula que estarían incrementando la susceptibilidad a la injuria oxidativa.

De otro lado, se sabe que la autooxidación de la glucosa produce radicales libres que podrían producir una contracción similar a la observada en el presente trabajo por la xantina oxidasa.

De manera similar a la condición de hiperglucemia aguda, los radicales libres derivados del oxígeno producidos por la xantina oxidasa causaron inhibición de la relajación inducida por ACh cuando los anillos fueron incubados con glucosa control.

Estos resultados están de acuerdo con reportes previos que señalan que los EROs inactivan a los factores relajantes del endotelio y selectivamente atenúan la relajación dependiente del endotelio.

Este trabajo también reporta que la relajación dependiente del endotelio en los vasos sanguíneos diabéticos es más sensible a la injuria inducida por radicales libre.

Finalmente, señalaremos que los resultados obtenidos sugieren que la generación de radicales libres durante la exposición a hiperglicemia aguda participan en la alteración de la capacidad vasoactiva del endotelio y que por tanto, el estrés oxidativo resultante puede ser la base por la cual la hiperglicemia induce las complicaciones vasculares conocidas que ocurren en la diabetes mellitus.

Otros trabajos señalan incremento de radicales libres en células rojas, plasma y retina de animales diabéticos así como en humanos. Lo cual sugiere el empleo de antioxidantes en el tratamiento de la diabetes mellitus que contrarresten el efecto del alto nivel de glucosa circulante.

Este estudio confirma que la incubación de los anillos aórticos en una solución hiperglicémica se manifiesta una disfunción endotelial persistente similar a los pacientes diabéticos tipo 1. Al mismo tiempo, la posibilidad de mejorar la función endotelial en la diabetes tipo 1 usando antioxidantes, en particular vitamina C, ha sido confirmada. Sin embargo, por primera vez, somos capaces de demostrar que el alopurinol normaliza la glucemia, mejorando la función endotelial.

El papel del estrés oxidativo parece ser crucial. Cuando función endotelial es aún alterada después de 12 h de normalización de glicemia debido al tratamiento con alopurinol.

Nuestros datos confirman que la hiperglicemia induce disfunción endotelial a través de la generación de estrés oxidativo y que la administración de alopurinol restaura la función endotelial y reduce los radicales libres en plasma normalizando los niveles de glucosa. Sin embargo, recientemente, han demostrado, en un modelo animal, que es la reducción de la glucosa más importante (por su efecto tóxico) que la acción de la insulina para mejorar la función endotelial. Sugiriendo que una larga exposición a niveles altos de glucosa induce una permanente alteración de las células endoteliales conduciendo a una disfunción endotelial permanente.

Nuestros datos sugieren que esta alteración permanente induce una disfunción endotelial a través de la generación de estrés oxidativo la cual se normaliza con la administración de vitamina C y con insulina.

Estas evidencias sugieren la existencia de dos diferentes vías para la generación de disfunción endotelial en la diabetes tipo 1: uno directamente relacionado con la hiperglicemia y otro no. La explicación de este segundo camino puede ser, por el momento, sólo especulativa apuntado recientemente el rol de la hiperglicemia en la sobre producción de anión superóxido durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES

#### 1. Primera.-

La administración al baño de las dosis crecientes de acetilcolina producen una respuesta vasodilatadora que es dependiente de la dosis.

#### 2. Segunda.-

Los anillos aórticos incubados en la solución hiperglicémica mostraron un deterioro en su relajación en respuesta a las tres dosis de acetilcolina, mostrando un efecto altamente significativo con la dosis de  $10\mu\text{M}$ .

#### 3. Tercera.-

Son los anillos aórticos tratados con alopurinol, expuestos a hiperglicemia aguda que recuperan su efecto vasodilatador a las tres dosis de acetilcolina.

## SUGERENCIAS

1. Desarrollar el presente estudio en humanos al confirmar los resultados, de tal manera recomendar el empleo de antioxidantes como terapia complementaria al manejo de una Diabetes.
2. Durante el tratamiento de la Diabetes se recomienda que aparte de utilizar un hipoglucémico, simultáneamente utilizar un antioxidante.



## ANEXOS

### Anexo 1



#### CENTRO DE ATENCION FARMACEUTICA (CAF DIGEMID)

#### Alopurinol

Tableta 100mg

Riesgo en el embarazo equivalente a la categoría FDA: C

#### Indicaciones

(1) Artritis gotosa crónica primaria o secundaria. (2) Profilaxis y tratamiento de hiperuricemia (secundaria a discrasias sanguíneas o lisis de tumores provocados por quimioterapia) y nefropatía inducida por ácido úrico. (3) Profilaxis de litiasis renal por ácido úrico y oxalato de calcio.

#### Dosis

Discontinuar el tratamiento durante las crisis agudas de gota y reiniciarlo progresivamente al ceder el cuadro agudo. Si bien el rango terapéutico es entre 100 y 800mg, la mayoría de pacientes responden adecuadamente con dosis de 300mg/día como dosis única. Después de 48 h puede ser necesario ajustar la dosis, de acuerdo a la respuesta del paciente.

Adultos: Artritis gotosa: Inicialmente, 100mg VO, 1 vez, incrementando 100mg semanal, hasta un máximo de 800mg/día. Mantenimiento, 200 a 300mg (gota leve) ó 400 a 600mg VO (gota moderadamente severa), 1 vez/día.

Profilaxis de hiperuricemia por terapia antineoplásica: Inicialmente, 600 a 800mg/día VO, comenzar 2 a 3 días antes de iniciar la quimioterapia o radioterapia.

Mantenimiento, de acuerdo a determinaciones séricas de ácido úrico.

Litiasis por ácido úrico: 100 a 200mg c/6 a 24 h ó 300mg/día.

Litiasis por oxalato cálcico: 200 a 300mg/día VO, en una o varias tomas. En insuficiencia renal: de acuerdo a la depuración de creatinina.

Depuración de creatinina (mL/min)	Dosis
10 – 20	200 mg/d
3 – 10	100 mg/d
<3	100 mg a intervalos superiores a 24 h

Niños: menores de 6 años: 50mg VO c/8 h.

De 6 a 10 años: 100mg VO c/8 h ó 300mg VO 1 vez/día.

Avenida Arenales 1302 Interior 201 – Jesús María  
Teléfono: 470 – 7836 Correo electrónico: [caf@digemid.minsa.gob.pe](mailto:caf@digemid.minsa.gob.pe)

#### Farmacocinética

Luego de la administración por vía oral, alrededor de un 80 a 90% se absorbe a nivel del TGI. Distribución amplia en la mayoría de fluidos y tejidos del organismo; se excreta en la leche materna. El alopurinol y su metabolito (oxipurinol) no se unen a Proteínas plasmáticas. Es metabolizado por la xantina oxidasa principalmente en el hígado a su metabolito activo oxipurinol. Su  $t^{1/2}$  es de 1 a 3 h como Alopurinol y de 12 a 30 h como oxipurinol. Excreción principalmente renal, un 10% de la dosis se excreta como alopurinol y aproximadamente el 70% se excreta como oxipurinol; el resto se puede excretar en las heces. El alopurinol y oxipurinol son dializables.

#### Precauciones

(1) Embarazo: no se han realizado estudios adecuados que demuestren problemas. Categoría de riesgo para el embarazo: C. (2) Lactancia: se excreta en la leche materna, sin embargo, no se han determinado efectos adversos en el lactante. (3) Pediatría: estudios realizados no han demostrado problemas, su uso debe limitarse a niños con desórdenes congénitos del metabolismo de las purinas o hiperuricemia secundaria a neoplasias o quimioterapia de cáncer. (4) Geriatría: no se han demostrado problemas, este grupo es más sensible a los efectos de este fármaco; se recomienda ajustar la dosis en casos de Insuficiencia renal. (5) Insuficiencia renal: corregir las dosis, según la depuración de creatinina. (6) Insuficiencia hepática: no se han realizado estudios que demuestren la necesidad de ajustar la dosis. (7) Insuficiencia cardíaca, congestiva, diabetes mellitus e hipertensión arterial: producen acumulación del metabolismo oxipurinol, incrementando el riesgo para ocasionar severas reacciones alérgicas, otros efectos adversos e Insuficiencia renal.

#### Contraindicaciones

Hipersensibilidad al alopurinol

#### Reacciones adversas

Frecuentes: dermatitis alérgica (rash, icterosis).

Poco frecuentes: diarrea, indigestión, náusea o vómito, dolor abdominal, somnolencia, cefalea.

Raras: náusea, vómito, escalofríos, dolores musculares y fiebre; neuritis periférica; necrólisis epidérmica tóxica (enrojecimiento, sensibilidad, prurito, escozor, piel escamosa o irritación ocular), dermatitis exfoliativa, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson; discrasias sanguíneas, incluyendo agranulocitosis, anemia, anemia aplásica, leucopenia, pancitopenia o trombocitopenia; litiasis renal por xantina, insuficiencia renal aguda.

#### Tratamiento de sobredosis y de efectos adversos graves

Medidas generales.

#### Interacciones

##### Medicamentos

Inhibidores de la ECA: Incremento del riesgo de toxicidad de los IECA, especialmente en Insuficiencia renal.

Ampicilina y amoxicilina: el uso simultáneo con alopurinol puede aumentar significativamente la incidencia de rash cutáneo.

Anticoagulantes: aumento del riesgo de hemorragias.

Ciclosporina: riesgo de neurotoxicidad al elevarse los niveles plasmáticos de este Inmunesupresor.

Azatioprina, mercaptopurina y ciclofosfamida: se incrementa la toxicidad de estos citotóxicos, especialmente, sobre la médula ósea.

Clorpropamida: Incremento del riesgo de hipoglucemia.

Avenida Arenales 1302 Interior 201 – Jesús María  
Teléfono: 470 – 7836 Correo electrónico: [caf@digemid.minsa.gob.pe](mailto:caf@digemid.minsa.gob.pe)

#### **Alimentos**

La absorción disminuye con los alimentos. Se recomienda administrar después de las comidas para evitar la irritación gastrointestinal. Alteraciones en pruebas de laboratorio Actividad sérica de fosfatasa alcalina, concentraciones séricas de bilirrubina y actividad sérica de transaminasa: pueden aumentar los valores fisiológicos/análisis. Concentraciones de nitrógeno ureico en sangre y concentraciones séricas de creatinina: pueden aumentar los valores fisiológicos/ análisis.

#### **Almacenamiento y estabilidad**

Mantener por debajo de 40°C preferiblemente entre 15 y 30°C  
Conservar en envases herméticos.

#### **Información básica para el paciente**

Al primer signo de rash, sangre en la orina, irritación ocular, hinchazón de labios o boca, discontinuar la medicación y consultar inmediatamente a su médico. Mantener una ingesta adecuada de líquidos (mínimo 2 L/d) durante la terapia para prevenir la litiasis renal. Puede ocasionar somnolencia, en este caso no realizar actividades que requieran un estado de alerta, como manejar vehículos.

Avenida Arenales 1302 Interior 201 – Jesús María  
Teléfono: 470 – 7836 Correo electrónico: [caf@digemid.minsa.gob.pe](mailto:caf@digemid.minsa.gob.pe)

## BIBLIOGRAFIA

1. Barja de Quiroga, G.; Radicales Libres y Antioxidantes. Departamento de Biología Animal II. Universidad Complutense de Madrid. España 2007; vol.: 2; pag.: 24 – 25.
2. Campos, C.; Sala Mercado, J.; Diferencias Relacionadas con el Sexo. Anatomía / Fisiología Cardiovascular en la Mujer. 2005. Cap.: II. Pag.:15 - 33
3. Cap. Venero Gutierrez, J.R.; Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”; Ciudad de la Habana, Cuba. 2002; vol.: 31; n°: 2; pag.: 126 – 33.
4. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. The New England Journal of Medicina. 1994 vol.: 330; n°: 15; pag.: 1036-1040.
5. Cunningham, J. Fisiología Veterinaria. 1999. McGraw-Hill interamericana. Ciudad de México. México. 2ª Ed.
6. Dalli Peydró, E. Evaluación de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes. Seminarios de diabetes. Técnicas diagnósticas en diabetes (II). Servicio de Cardiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Av Diabetol 2005; vol.:21; pag.: 292-301.
7. Dalli Peydró, E.; Técnicas diagnósticas en diabetes. Evaluación de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes. Valencia, España 2005; vol.:21; pag.:2929 – 301.

8. Dirección General de medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Centro de Atención Farmaceutica (CAF DIGEMID). Alopurinol
9. GADOR S.A; Allopurinol GADOR 100 – Allopurinol GADOR 300 / ALLOPURINOL; Buenos Aires, Argentina; 2012; pag.:1 - 14
10. Gal I., B; López G., M; Martin V., A; Prieto M., J; Bases de la Fisiología. 2007; 2da Edición. Vasos Sanguineos. Editorial Tebar; vol.:180; pag.: 6.6
11. Ganong, W. 1998. Fisiología Médica. 16ª ed., El manual moderno. Ciudad de México.México.
12. Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature Lond. 1986 Vol.:320; pag.: 454-456.
13. Guyton, Arthur C. Tratado de Fisiología Médica. 2001. 10ma. Edición. México Edit. Interamericana. Tomo I.
14. Guzmán, L.; Cuneo, C.; De Rosa, J.; Kisen Briger, O.; Lorenzatti, A.; Righetti, J.; Waisman, J.; Resumen de las Normativas del Primer Grupo de Consenso en Prevención Cardiovascular. Rev Fed Arg Cardiol 1999; vol.: 28; pag.: 399 - 414.
15. Goodman y Gilman. "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica" Novena edición, volumen I, Edit McGraw-Hill. 1998.
16. HARDMAN, J.; LIMBIRD, L.; GOODMAN A.; The pharmacological basis of therapeutics. 2001. McGraw-Hill. New York. U.S.A. 10th Ed.

17. Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to vascular system. *Haemstasis*. 1993 Mar; 23 Suppl 1: 118-26
  
18. Hernández Rodríguez, P. Ciencia y Tecnología para la salud Visual y Ocular. Líneas de defensa contra la producción de radicales libres en diabéticos con retinopatía. Julio – diciembre 2005. Vol.:5; pag.:59-65.
  
19. Hornig B, Arakawa N, Kohler C. Drexler H. Vitamin E improves endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998; vol.: 97; pag.: 363-368.
  
20. Korc, I.; Bidegain, M.; Martell, M.; Radicales Libres. Bioquímica y sistemas antioxidants implicancia en la patología neonatal. *Rev. Medica Uruguay*. 1995. Vol.: 11. N°: 2. Pag.: 121 – 135.
  
21. Maldonado Savedra, O.; Jimenez Vasquez, E. N.; Bernabé Guapillo Vargas, M. R.; Ceballos Reyes, G. M.; Méndez Bolaina, E. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med. Universidad Veracruzana*. Mexico. 2010. Pag.: 33 – 39.
  
22. Mayhan, W.; Simmons, L. K. and Sharpe, G. M. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol*. 1991. Vol.: 260 (Heart Circ. Physiol.); n° 29; Pag.: H319-H326.
  
23. Meana, J.J.; García-Sevilla, J.A. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. 1997. En: Flórez, J. *Farmacología humana*. 3ª ed.. Ed. Masson. Barcelona. Pag.: 235-260.

24. Miranda H, R; Castro G, P; Verdejo P, H; Chiong, M; Díaz-Araya, G; Mellado, R; Rojas, D; Concepción, R; Lavandera, S. Estrés oxidativo e inflamación en insuficiencia cardiaca. Mecanismos de daño y alternativas terapéuticas. Rev. Med Chile 2007; vol.: 135; n°: 8; pag.:1056 – 1063.
25. Sabán Ruiz, J.; El endotelio sano y enfermo: Control global del riesgo cardiometabólico, Endotelio sano: papel estelar del óxido nítrico. 2012; Ediciones Díaz de Santos cap. 3.; pag.: 81- 85; 88.
26. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L. Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. Circulation. 1998; vol.: 97; pag.: 2222-2229.
27. Tesfamariam, B., and Cohen, R. A. Role of superoxide anion and endothelium in vasoconstrictor action of prostaglandin endoperoxide. Am. J. Physiol. 1992; vol.: 262 (Heart Circ. Physiol.); n° 31. Pag.: H1915-H1919.
28. Tresguerres, J.F.; Aguilar, E.; Cachofeiro, M.V.; Cardinali, D.; Gil, P.; Lahera, V.; Martínez, J.A.; Mora, F.; Rodríguez, R.; Romano, M.; Tamargo, J.; Zarco, P.; Fisiología humana; Mcgraw-Hill Interamericana. Madrid. España. 2000. 2ª Ed.
29. Vander, A.J.; Sherman, J.H.; Luciano, D.S.; Human Physiology. The mechanisms of body function. 2001. McGraw-Hill Interamericana. Boston. U.S.A. 8th ed.
30. Venereo Gutiérrez, J.R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes Rev Cubana Med Milit. 2002. vol.:31 n°:2. Pag.:126-33.
31. Wolff, S. P., and R. T. Dean. Glucose autoxidation and protein tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. Diabetes 1987. vol.: 36. Pag.: 1014-1018.

32. [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lqf/mundo\\_a\\_jn/capitulo1.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/mundo_a_jn/capitulo1.pdf)

33. <http://www.sediabetes.org/resources/revista/00011463archivoarticulo.pdf>

34. <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/IntegradoTercero/ApFisiopSist/nutricion/NutricionPDF/DiabetesMellitus.pdf>.

35. <http://gmorales.mayo.uson.mx/BALANCEO%20DE%20REACCIONES%20QUIMICAS.pdf>.

36. <http://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>

37. <http://www.merckmillipore.com/peru>

