



El “erizo de mar” *Tetrapygus niger* como marcador biológico de estrés oxidativo

Sea urchin *Tetrapygus niger* as a biological marker of oxidative stress *

Doris Huerta Canales, Raquel Oré Sifuentes y Marco Núñez Fonseca

ABSTRACT

In this research the sea urchin *Tetrapygus Niger* has been used as a model to study oxidative stress to measure the lipid peroxidation in sperm nuclei. Oxidative stress was observed in sperm nuclei with and without hydrogen peroxide, which is a good free radicals generating system.

Key words: Oxidative stress, lipid peroxidation, Tetrapygus Niger, hydrogen peroxide.

Todos estamos expuestos a la radiación electromagnética tanto natural como artificial. La radiación divide el agua del cuerpo generando radicales hidroxilo (OH) altamente reactivos que frecuentemente dejan tras sí una secuencia en cadena de radicales libres en propagación. El cuerpo produce otro radical de oxígeno, el superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Aproximadamente el 3% de oxígeno que respiramos es usado para producir $O_2^{\cdot-}$, produciendo más de 2 K de $O_2^{\cdot-}$ en el cuerpo cada año y las personas con infecciones crónicas pueden producir aún más.

Los radicales libres de oxígeno (OFR_x) son potencialmente muy tóxicos para las células, y debido a su naturaleza altamente reactiva son moléculas o átomos catiónicos, aniónicos o neutros que pueden fácilmente combinarse con otras moléculas, tales como enzimas, receptores, bombas iónicas, causando su oxidación directamente e inhibiendo su normal funcionamiento. Algunos de los productos de ataque de los OFR pueden interferir con el funcionamiento del DNA (Halliwell y Auroma,

1991; Beckmam y Bruce, 1997; (generar alteraciones en la secuencia de bases con el potencial para mutaciones, que en casos extremos conduce a situaciones patológicas): puede cambiar las proteínas, generando nuevas estructuras inmunogénicas. Los OFRs son definidos como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados y son parte de un grupo de moléculas denominadas *especies reactivas de oxígeno* (ROS) que se originan de varias maneras, principalmente por reacciones redox que involucran al oxígeno y que se produce como parte del metabolismo normal, por ejm. $O_2^{\cdot-}$, NO^* , H_2O_2 (Halliwell B., 1991).

En respuesta a la exposición de radiación UV, contaminación ambiental, humo de cigarrillo, ejercicio excesivo, isquemia: $O_2^{\cdot-}$, OH^* , ROO^* . Así, el radical OH^* es altamente reactivo y ataca a moléculas biológicas; el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) viaja a través de la sangre actuando como vasodilatador, interviene en la regulación del crecimiento y en señales intracelulares. El óxido nítrico (NO^*) (Beckman y cols., 1990) actúa en las células de los músculos lisos, causa relajación de las paredes de los vasos

sanguíneos. El radical peróxido (H_2O_2) atraviesa fácilmente las membranas celulares y puede causar la expresión de genes virales. Uno de sus efectos más destructivos es la iniciación de lipoperoxidación, que conduciría a la destrucción de la membrana celular. Un radical puede extraer un hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado en la membrana celular y generar un dieno conjugado, el cual después de un rearreglo, fácilmente se combinaría con el oxígeno para dar un radical peroxil-lipídico (iniciación); este en una segunda vuelta puede extraer un hidrógeno a partir de otro ácido graso poliinsaturado (propagación) para dar un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico que luego repite la cadena de eventos. Si no termina esta cadena de reacciones se llegaría a la destrucción de las membranas celulares, ruptura de compartimientos y liberación de enzimas lisosomales y posterior autólisis. Esta reacción en cadena genera moléculas inestables responsables de la aparición de enfermedades degenerativas: cáncer, artritis, diabetes, el proceso de envejecimiento (Halliwell, B., 1995). La terminación de esta cadena de eventos es posible debido a la participación de sistemas antioxidantes que destruyen los radicales libres producidos. Normalmente en la célula están presentes, en gran número y diversidad, los antioxidantes, tales como vitamina C, que actúa a nivel citosólico; la vitamina E, cuya acción es a nivel de membrana; la *glutation* que protege tanto al citosol como a la membrana del ataque de los radicales libres. Otros antioxidantes presentes son las enzimas, como glutación peroxidasa (GPX), glutación reductasa, glutación transferasa, catalasa (hidrolisa el peróxido a oxígeno y agua) y la enzima superóxido dismutasa (SOD), que convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno.

Otros antioxidantes importantes incluyen carotenoides y ubiquinonas. Esta vasta red de defensas antioxidantes intracelulares y extracelulares es una prueba convincente de que los OFRs son producidos en condiciones

fisiológicas normales y que sus niveles pueden ser fuertemente regulados para la supervivencia celular.

El objetivo del presente trabajo ha sido utilizar al erizo como modelo para evaluar el estrés oxidativo (EO) midiendo lipoperoxidación en núcleos de espermatozoides.

El material biológico que se usó fue erizos de mar *T. niger*, recolectados en la playa de San Bartolo, Lima, durante los meses de marzo a julio en cantidades que van de 100 a 150 erizos por colecta.

El esperma del erizo de mar fue extraído por inyección celómica de 1 mL de KCl 0,5 mol/L y lavado con agua de mar filtrada; luego se lavó varias veces con NaCl 0,15 mol/L, hasta obtener el pellet limpio centrifugando a 3500 rpm por 10 minutos, en algunos casos se trabajó fresco y en otros se congeló. Los núcleos fueron extraídos a partir de pellet y homogenizados en buffer A: Tris HCl 10 mmol/L pH 7,5, sucrosa 0,25 mol/L, $MgCl_2$ 10 mmol/L, $CaCl_2$ 3 mmol/L, Cloruro de benzamidina 50 mmol/L, se centrifugó a 3500 rpm x 10 min. Se lisó en buffer A con Tritón X 100, 0,1%; se centrifugó, resuspendió en Tris HCl 10 mmol/L pH 8, NaCl 0,15 mol/L, $CaCl_2$ 0,5 mmol/L, PMSF 2 mmol/L. Para el aislamiento de núcleos se utilizó el método del colchón de sucrosa centrifugando a 5000 rpm por 5 min. se trabajó con el pellet. La lipoperoxidación se determinó midiendo la formación de malondialdehído (MDA): A 0,3 mL de muestra se agregó 0,6 mL de TCA 20g/dL, se hirvió en baño María durante 10 min. se enfrió y se agregó TBA (Ácido Tiobarbitúrico) 0,67 g/dL en HCl 0,09 mL. Se hirvió en baño María 30 min. se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, se enfrió y midió la absorbancia a 535 nm.

Utilizando el coeficiente de extinción para MDA = 156000M. Se agregó 10 mmol/L de H_2O_2 , se incubó durante 30 min. a 37 °C, se midió la variación de formación de MDA a

diferentes concentraciones de H_2O_2 y en función del tiempo.

Hay muchas maneras de estudiar y medir radicales libres, pero todos coinciden con los principales problemas asociados a su alta reactividad, principalmente su vida media relativamente corta, lo que dificulta su medición.

La evaluación del estrés oxidativo (EO) se realizó determinando lipoperoxidación, siendo el indicador usado la formación de un producto secundario, el complejo coloreado del malondialdehído (MDA) (Buege y col., 1978).

En la reacción de lipoperoxidación una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de TBA produciendo un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre 532-535nm. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg de proteína total, considerando además el peso del pellet de esperma.

Indujimos peroxidación lipídica con concentraciones crecientes de H_2O_2 como 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{mol/L}$ (Tabla 1) observando que con 20 $\mu\text{mol/L}$ de H_2O_2 se obtienen la mayor formación de MDA, y a concentraciones

mayores de 100 $\mu\text{mol/L}$ la lipoperoxidación descende notablemente, lo que concuerda con lo reportado por Cochrane (1991). Ello podría deberse a un efecto de saturación, es decir, se ha llegado a formar una concentración de hidroperóxidos lipídicos en tal magnitud que destruyen la membrana y escapan de ella para producir alteraciones a distancia, o podríamos pensar que estos productos de radicales libres se degradan causando interferencias que impiden su medición. También se evaluó la lipoperoxidación con concentración constante de H_2O_2 de 10 $\mu\text{mol/L}$ variando los tiempos (0, 15, 30, 60 y 120 min). Los resultados observados en la Tabla 2 muestran mayor formación de MDA a los 60 min, luego comienza a descender, pero a los 15 min. ya hay formación de MDA. Algunos autores reportan que a los 5 min. de incubación ya hay lipoperoxidación. El descenso podría deberse a una inestabilidad del cromógeno para dicho tiempo. Los valores obtenidos para las muestras de núcleo control sin H_2O_2 están en el rango de $3,54-3,69 \times 10^{-6}$ mol/L de MDA, lo que significaría que los efectos de radicales libres se deberían a contaminantes del medio acuático. La bibliografía consultada no reporta valores normales para el erizo de mar, pero sí en el caso de ciertas enfermedades, por ejm.

Tabla 1. Variación de la Concentración de MDA en Función de Concentraciones Crecientes de H_2O_2 Incubados a 37° C por 30 min

	D. O.	[H_2O_2]mM	[MDA] 10^{-6} M	[MDA] 10^{-9} M/g pellet	[MDA] 10^{-11} M/mg PT
Control	0,092	0	3,54	8,45	4,04
1	0,103	10	3,96	9,45	4,52
2	0,153	20	5,89	14,1	6,72
3	0,155	50	5,97	14,2	6,80
4	0,130	100	4,99	11,9	5,69

diabetes: (control) de 3 a 5 μM y de 5 a 9 μM en pacientes diabéticos.

En conclusión, hemos determinado los valores normales de MDA en el erizo de mar,

y como lo menciona la bibliografía el peróxido de hidrógeno es un buen sistema generador de radicales libres como se muestra en las tablas, ya sea que se incremente su concentración o el tiempo de incubación.

Tabla 2. Formación de MDA por Lipoperoxidación en Función del tiempo con concentración 10 μM de H_2O_2 a 37 °C

	Tiempo min	D. O.	[MDA] 10^{-6} M	[MDA] 10^{-9} M/gpellet	[MDA] 10^{-11} M mg PT
Control	0	0,096	3,690	8,81	4,21
1	15	0,120	4,619	11,00	5,26
2	30	0,215	8,280	19,80	9,45
3	60	0,480	18,48	44,10	21,10
4	120	0,386	14,82	35,40	16,90

LITERATURA CITADA

- Beckman, J. S. and col. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:1620.
- Beckman, K. and Bruce A. 1997. JBC. 272: (32)19633-36.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. 1978. Methods in Enzymology 52: 302-310.
- Cochrane, Charles G. 1991. The American Journal of Medicine. Vol. 91 (suppl 3C): 23S-30S.
- Halliwell, B. and Gtteridge, JMC, 1984. Biochem. J., 219: 1-4.
- Halliwell, Barry. 1991. The American Journal of Medicine, Vol. 91 (suppl 3C): 14S-22S.
- Halliwell B. and Auroma, OI. 1991. DNA Damage by Oxygen Derived Species. Its Mechanism and Measurement in Mammalian System. FEBS Lett.: 281: 9-19.
- Halliwell B. 1995. Ann. Rheum. Dis. 54:505.