

DISTRÈS OXIDATIU EN HUMANS. VALORACIÓ EN DIFERENTS SITUACIONS FISIOLÒGIQUES I PATOLÒGIQUES

Marta Romeu Ferran

Tesi Doctoral

Reus, 2006



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina
i Ciències de la Salut

AGRAÏMENTS

Voldria agrair a totes aquelles persones que, d'alguna manera, mitjançant el seu recolzament i col·laboració, m'han fet costat en les diverses etapes de realització d'aquesta tesi.

A la Dra. Giralt pel temps que ha invertit en aquest treball i per les ensenyances i orientacions que han fet possible la seva realització. A ella i a la Dra. Nogués agraeixo la dedicació científica i personal donada dins i fora del laboratori.

Al Dr. Mallol per la confiança, el recolzament i la dedicació donats en tot moment.

A tota la Unitat de Farmacologia, i en especial al Dr. Sureda, a la Vane i al Miquel per la motivació transmesa, per la seva companyia i per la feïnada que hem fet junts.

A la Dra. Cecilia Liñán del Servei d'Endocrinologia de l'Institut Universitari Dexeus de Barcelona, per la seva contribució en el subministrament de mostres de casos sense patologia.

Al Dr. Alberto Martínez Vea del Servei de Nefrologia de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, per la provisió de les mostres de sang de pacients amb insuficiència renal i el recolzament financer aportat a través de la Fundació URV.

Al Dr. Rello, l'Alejandro i la Sandra de la Unitat de Cures Intensives de l'Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, per la provisió i tractament de les mostres de sang de pacients amb sèpsia i IAM.

Al Dr. Aguilar del Servei de Pneumologia de l'Hospital Joan XXIII, a la Dra. Texidó, la Dra. Tomas i el Dr. Hernandez del Servei de Pneumologia de l'Hospital Sant Joan, per la provisió de les mostres de sang de pacients amb MPOC.

A la Unitat de Medicina Preventiva i en especial a la Dra. Arija i la Núria Aranda, per la provisió i tractament de les mostres de sang de dones embarassades, i pels bons moments que hem passat juntes.

Als alumnes interns de Farmacologia, la Gemma i el Manel, que van treballar de valent per tirar endavant l'estudi dels estudiants universitaris.

Al Dr. Josep Maria Mateo i el Dr. Joan Fernández per la seva col·laboració en la part estadística del treball d'investigació.

A tots els voluntaris, molts d'ells familiars i amics, que s'han deixat extreure sang, sobretot als alumnes de Medicina, Fisioteràpia, Nutrició i de L'Aula de la Gent Gran de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut.

A tots els membres del Grup Farbiol pel seu entusiasme per la feina ben feta i per contribuir activament a la meva formació com a investigadora. I especialment a la Unitat de Bioquímica que va confiar en mi a l'hora d'atorgar-me una beca URV.

A tots els companys de la Facultat de Medicina que m'han encomanat les ganes d'aprendre i de seguir endavant per aquest camí. Als becaris, PDI i PAS, moltes gràcies, sense vosaltres no hauria pogut fer aquest treball.

A tots els companys i amics que vaig deixar a la Facultat de Medicina d'Oviedo, i al grup de recerca de la Dra. Ana Coto, gràcies per fer-me sentir com a casa des del primer fins a l'últim minut de la meva estada amb vosaltres.

A la Universitat Rovira i Virgili per concedir-me la beca URV.

A l'AGAUR per concedir-me la beca BE.

Als meus pares, germans i avis, sense ells res hauria estat possible, a la meva correctora de català personal, a la família Alegre, i a la meva petita família, Nando i Oriol, gràcies per la vostra paciència, us tornaré tot el temps que us he robat amb interessos, paraula.

Al meu avi.

I a tots els que han contribuït de manera directa o indirecta en la realització d'aquest treball d'investigació.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	8
1. OXIDANTS I ANTIOXIDANTS	9
1.1. RADICALS LLIURES I ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN (ERO)	9
1.1.1. ORIGEN DELS RADICALS LLIURES	12
1.1.2. TIPUS D'ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN	15
1.1.3. MECANISMES DE PRODUCCIÓ DELS RLLO I LES ERO	17
1.1.4. FONTS DE RLLO I D'ERO	22
1.2. SISTEMES ANTIOXIDANTS	27
2. EL DISTRÈS OXIDATIU	34
2.1. EL DANY OXIDATIU: LÍPIDS, PROTEÏNES I DNA	37
2.1.1. DANY OXIDATIU ALS LÍPIDS	37
2.1.2. DANY OXIDATIU A LES PROTEÏNES	42
2.1.3. DANY OXIDATIU AL DNA	43
3. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	45
3.1. BIOMARCADORS DE L'ESTAT OXIDATIU	47
3.1.1. PRODUCTES DE L'ESTRÈS OXIDATIU	49
3.1.1.1. PROMOTORS	49
3.1.1.2. INHIBIDORS	51
3.1.1.2.1. ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	51
3.1.1.2.2. ENZIMS I MACROMOLÈCULES	55

3.1.1.3. PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ	63
3.1.1.3.1. PEROXIDACIÓ DE LÍPIDS	64
3.1.1.3.2. PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES	65
3.1.1.3.3. PEROXIDACIÓ DEL DNA	65
3.1.2. SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ	68
3.1.3. CAPACITAT ANTIOXIDANT	69
3.2. L'ESTRÈS OXIDATIU EN DIFERENTS SITUACIONS	70
3.2.1. ESTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS PATOLÒGIQUES	70
3.2.1.1. INSUFICIÈNCIA RENAL	70
3.2.1.2. MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA	72
3.2.1.3. SÈPSIA	73
3.2.1.4. INFART AGUT DE MIOCARDI	75
3.2.2. ESTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS FISIOLÒGIQUES	76
3.2.2.1. ENVELLIMENT	76
3.2.2.2. GÈNERE	78
3.2.2.3. EMBARÀS	79
3.2.2.4. ESTRÈS PSICOLÒGIC	80

HIPÒTESI I OBJECTIUS

82

MATERIAL I MÈTODES

86

1. DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

87

1.1. CONTROLS SANS	88
1.2. INSUFICIÈNCIA RENAL	89
1.3. MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA	90
1.4. SÈPSIA I INFART AGUT DE MIOCARDI	91
1.5. ENVELLIMENT	92
1.6. GÈNERE	92
1.7. EMBARÀS	92
1.8. ESTRÈS PSICOLÒGIC	93
2. OBTENCIÓ, PREPARACIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES	95
2.1. TUB D'HEPARINA-LITI	95
2.2. TUB D'EDTA	97
	98
3. MÈTODES UTILITZATS	98
3.1. DETERMINACIÓ DE L'HEMATOCRIT I L'HEMOGLOBINA	99
3.2. DETERMINACIÓ D'INHIBIDORS: ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	99
3.2.1. GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT	99
3.3. DETERMINACIÓ D'INHIBIDORS: ENZIMS I MACROMOLÈCULES	100
3.3.1. SUPERÒXID DISMUTASA	100
3.3.2. GLUTATIÓ PEROXIDASA	101
3.3.3. CATALASA	102
3.3.4. GLUTATIÓ REDUCTASA	103
3.3.5. GLUTATIÓ S-TRANSFERASA	103

3.4. DETERMINACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA: TBARS	105
3.5. DETERMINACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ: TEST D'HEMÒLISI	106
4. PUNTUACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU	108
4.1. PUNTUACIÓ D'INHIBIDORS: ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR	110
4.1.1. PUNTUACIÓ DEL GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT	110
4.2. PUNTUACIÓ D'INHIBIDORS: ENZIMS I MACROMOLÈCULES	111
4.2.1. PUNTUACIÓ DE LA SUPERÒXID DISMUTASA	111
4.2.2. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ PEROXIDASA	113
4.2.3. PUNTUACIÓ DE LA CATALASA	114
4.2.4. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ REDUCTASA	115
4.2.5. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ S-TRANSFERASA	116
4.3. PUNTUACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA	118
4.4. PUNTUACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ	119
5. ESTUDI ESTADÍSTIC	122
RESULTATS I DISCUSSIÓ	125
1. DISTRÈS OXIDATIU EN CONTROLS SANS	126
1.1. RANGS DE NORMALITAT	126
1.2. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	128
2. DISTRÈS OXIDATIU EN LA INSUFICIÈNCIA RENAL	136

3. DISTRÈS OXIDATIU EN LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA	146
4. DISTRÈS OXIDATIU EN LA SÈPSIA I L'INFART	150
5. DISTRÈS OXIDATIU EN L'ENVELLIMENT	157
6. DISTRÈS OXIDATIU EN EL GÈNERE	161
7. DISTRÈS OXIDATIU EN L'EMBARÀS	167
8. DISTRÈS OXIDATIU EN L'ESTRÈS PSICOLÒGIC	175
9. PUNTUACIÓ ESTADÍSTICA DISCRIMINANT	182
9.1. DISCRIMINANTS EN LA INSUFICIÈNCIA RENAL	185
9.2. DISCRIMINANTS EN LA INSUFICIÈNCIA RENAL: TRACTAMENT AMB EPO	188
9.3. DISCRIMINANTS EN LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA	191
9.4. DISCRIMINANTS EN L'ENVELLIMENT	193
9.5. DISCRIMINANTS EN EL GÈNERE	195
9.6. DISCRIMINANTS EN L'EMBARÀS	198
9.7. DISCRIMINANTS EN L'ANÈMIA L·LIGADA A L'EMBARÀS	200
9.8. DISCRIMINANTS EN L'ESTRÈS PSICOLÒGIC D'ESTUDIANTS UNIVERSITARIS	202
9.9. DISCRIMINANTS EN L'ESTIL DE VIDA D'ESTUDIANTS UNIVERSITARIS	204
DISCUSSIÓ GLOBAL	207
CONCLUSIONS	222
BIBLIOGRAFIA	227
PUBLICACIONS PRÒPIES	242

1. ARTICLES I CAPÍTOLS DE LLIBRE	243
2. COMUNICACIONS A CONGRESSOS	243
ABREVIACIONS	246

“Oxygen? I rarely use it myself, sir. It promotes rust”

Robby the Robot, Forbidden Planet, 1956

El distrès oxidatiu és un estat de l'organisme provocat per un desequilibri entre els sistemes oxidants i antioxidants. Aquests sistemes es poden alterar en diferents situacions fisiològiques i patològiques a causa dels radicals lliures i de les espècies reactives de l'oxigen.

La toxicitat que provoquen aquestes molècules està condicionada per l'índex de formació i destrucció d'aquests radicals, pel material biològic afectat i pels sistemes antioxidants de l'organisme.

Per tant, conèixer els diferents radicals, els mecanismes d'acció, els seus efectes, així com la manera de neutralitzar-los és cada cop més necessari si volem pretendre millorar l'evolució d'algunes patologies o entendre determinats processos fisiològics.

INTRODUCCIÓ

1. OXIDANTS I ANTIOXIDANTS

1.1. RADICALS LLIURES I ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN

Els radicals lliures són molècules o fragments moleculars que contenen un o més electrons desaparellats a l'orbital més extern, i també han estat definits com a espècies químiques amb electrons de similar *spin* direccional. S'ha de recordar que els electrons, en els àtoms, ocupen regions de l'espai conegudes com a orbitals. Com es pot observar a la figura 1, en cada orbital hi ha com a màxim dos electrons amb *spins* direccionals oposats.

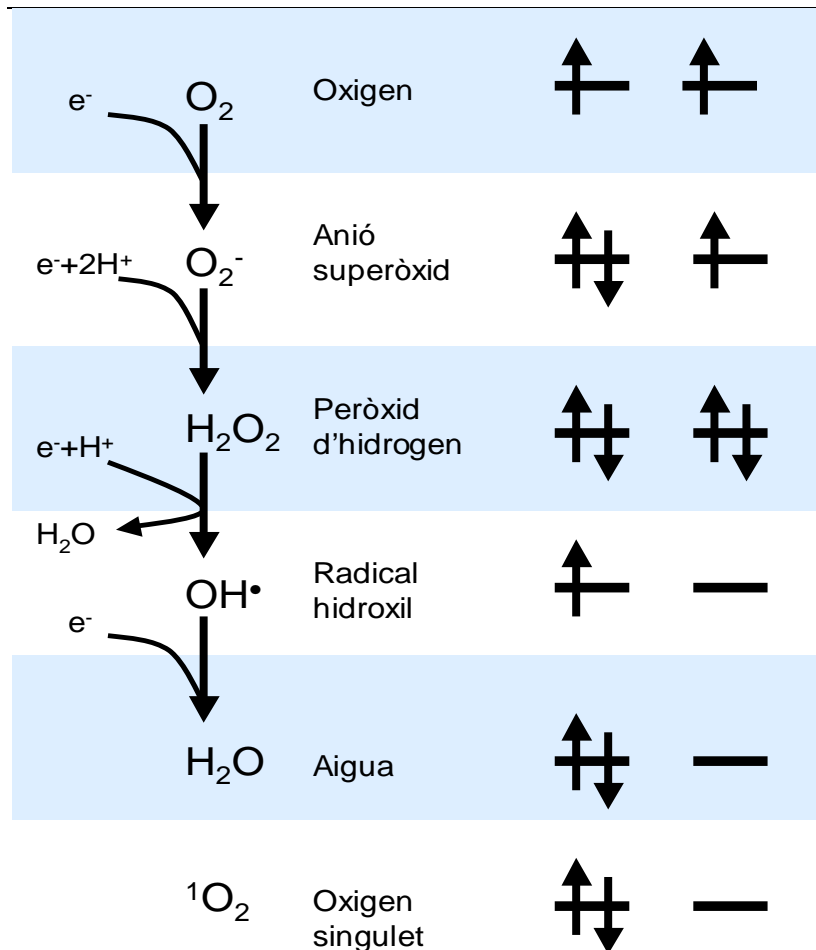
A principis del segle XX, Gomberg (1900) i Paneth (1923) ja van demostrar l'existència d'unes molècules relativament estables que tenien un electró desaparellat en l'orbital més extern, les quals es van definir com a productes de trencaments homolítics i corresponien als radicals trifenilmetil i alquil. Des de llavors, l'estructura dels radicals lliures (RLL) està representada pel símbol R^\bullet , en què el punt indica la presència d'un electró desaparellat, és a dir, que està sol a l'orbital. La majoria de molècules biològiques no tenen radicals, sinó que els seus electrons estan aparellats, ja que les molècules són més estables quan els electrons estan aparellats en l'orbital (Halliwell, *Br J Exp Path*, 1989).

Una molècula pot convertir-se en radical lliure tant per guany com per pèrdua d'electrons i també per fissió d'enllaços homolítics. En trencar-se un enllaç covalent de manera simètrica tots dos fragments retenen un electró i, per tant, es converteixen en un radical lliure. Aquest electró desaparellat confereix al radical lliure una gran inestabilitat tant energètica com cinètica, cosa que fa que siguin compostos altament reactius (Axelrod i col·ls., *Plast Reconst Surg*, 1990; De Paulet AC, *Ann Biol Clin*, 1990). Si el que fa el radical és donar o agafar un electró d'un no radical, aquest es transforma en radical i inicia una reacció en cadena que té com a resultat la generació de múltiples radicals lliures (Halliwell, *Br J Exp Path*, 1989).

El 1934, les reaccions relacionades amb els RLL es van classificar en: reaccions d'**iniciació** [es forma un radical lliure o centre de reacció], **propagació** [es conserva el nombre de radicals lliures amb formació de productes o desaparició de reactius], **inhibició** [es conserva el nombre de RLL amb desaparició de producte] i **acabament** [desapareixen dos radicals lliures per aniquilació i combinació dels seus dos electrons desaparellats] (Boveris, *Ars Pharm*, 2005).

En dels últims vint anys hi ha hagut un interès cada vegada més gran en l'estudi d'aquestes molècules i del seu comportament en els sistemes biològics. Hi ha molts treballs que pretenen aclarir les implicacions dels RLL en l'ésser humà, no solament la seva fisiologia a nivell molecular sinó també el seu comportament en diferents patologies, en les quals aquests elements poden generar-se com a conseqüència o a causa d'aquestes patologies. Aquest és també un dels objectius del nostre treball, però per arribar a entendre la importància que tenen els radicals lliures en l'ésser humà cal conèixer amb anterioritat les molècules que poden formar-los, els tipus de RLL existents i els mecanismes utilitzats per generar-los.

Figura 1. Estat dels *spins* direccionals



Estat dels *spins* direccionals de diverses molècules implicades en la cadena de reacció dels radicals lliures.

1.1.1. ORIGEN DELS RADICALS LLIURES:

Els RLL poden provenir de diferents molècules, entre les quals les següents:

- l'àtom d'hidrogen (H^{\bullet})
- l'oxigen molecular (O_2)
- els metalls de transició, com el ferro i el coure, que tenen un paper important en els processos de lipoperoxidació
- les molècules d'oxigen nitrogenades (NO_x), com el NO i el NO_2 , que són contaminants atmosfèrics
- els fosfolípids de les membranes, que en ser atacats per substàncies oxidants desencadenen la lipoperoxidació
- i qualsevol molècula que, en acceptar energia o per trencament d'enllaços, pot convertir-se en RLL

De totes aquestes molècules, en el nostre treball ens centrarem en la molècula d'oxigen. L'existència dels organismes superiors està condicionada per la presència d'oxigen. L'ésser humà és aerobi i, per tant, no pot existir sense l'oxigen; tanmateix, aquest oxigen és, a la vegada, perillós per a la seva existència ja que pot formar RLL: és la gran **paradoxa de l'oxigen**. Fridovich el 1978 cridava l'atenció sobre aquesta paradoxa amb les següents paraules: “de la mateixa manera que Jano l'oxigen té dues cares, una de benigna i l'altra de maligna. L'oxigen molecular és virtualment tòxic per a totes les formes de vida i aquesta toxicitat es fa evident en incrementar la seva concentració”.

Aquesta dualitat, coneguda des de fa molts anys, està començant a ser entesa a través de les espècies actives de l'oxigen i els **radicals lliures d'oxigen** (Thannickal, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003).

El perill de l'oxigen és inherent a la seva estructura. L'àtom d'oxigen en estat estable té vuit electrons, dos dels quals són imparells, amb *spin* paral·lel. La molècula d'oxigen (O_2) és doncs un bon agent oxidant ja que els hidrogenions que atrau ocupen els *spin* vacants en l'orbital i es col·loquen de manera antiparalel·la (figura 1). En captar energia, l'oxigen pot produir formes més reactives. Les espècies reactives de l'oxigen (ERO) més importants es detallen a la taula I.

L'oxigen molecular actua com a element oxidant en acceptar fins a quatre electrons a l'orbital més extern –reducció tetravalent– per donar lloc a dues molècules d'aigua. L' O_2 pot també sofrir una reducció univalent, divalent o trivalent, en acceptar un, dos o tres electrons, de la qual cosa en resulta la formació d'espècies reactives d'oxigen.

Els RLLO són les formes moleculars o atòmiques de l'oxigen que posseeixen un nombre imparell d'electrons en l'òrbita externa, ja sigui per fixació d'un electró suplementari, per transferència d'un electró a partir de l'òrbita interna o per la pèrdua d'un electró de l'òrbita externa.

Els RLLLO són molt reactius i tenen una gran capacitat de participar en reaccions en cadena, tot formant una cascada de radicals lliures susceptibles de desnaturalitzar i de destruir nombroses molècules biològiques com lípids, proteïnes i àcids nucleics (Junod, *Intensive Care Med*, 1989).

Sovint el terme *radical d'oxigen* és mal utilitzat, perquè s'assigna a tots els reactius intermedis de les espècies d'oxigen, incloent-hi totes les formes moleculars que no són radicals. Per aquest motiu seria més indicat parlar d' *espècies reactives d'oxigen* (ERO) en lloc de radicals lliures d'oxigen.

Taula I. Espècies reactives de l'oxigen (ERO)		
Radicals		
Hidroxil	$\cdot\text{OH}$	
Alcoxil	$\text{L(R)O}\cdot$	
Hidroperoxil	$\text{HOO}\cdot$	És l'àcid conjugat de l'anió superòxid, i és present en solució aquosa a concentracions dependents del pH
Peroxil	$\text{L(R)OO}\cdot$	
Òxid nítric	$\text{NO}\cdot$	Per ell mateix és poc reactiu i a vegades es veu com a antioxidant en la peroxidació lipídica, però en presència de superòxid forma peroxinitrit, que és molt oxidant
Superòxid	$\text{O}_2^{\cdot-}$	No és un bon oxidant però és capaç d'oxidar i reduir ions de metalls de transició. Com a resultat, genera H_2O_2 que pot a la vegada formar $\cdot\text{OH}$ en presència de ions reduïts de metalls de transició
No radicals		
Peroxinitrit	ONOO^-	
Hipoclorit	^-OCI	
Hidroperòxid	L(R)OOH	En presència de ions de metalls de transició, permet la formació de radicals alcoxil i peroxil
Oxigen singulet	$^1\Delta\text{O}_2$	
Peròxid d'hidrogen	H_2O_2	

Extret d'Abuja i cols., *Clin Chim Acta*, 2001

1.1.2. TIPUS D'ERO:

- El radical superòxid és una molècula d'oxigen que ha fixat un electró extern suplementari. Es representa amb el símbol $O_2^{\bullet -}$. Si bé aquest radical no és una espècie particularment reactiva, pot fàcilment travessar lípids de membrana per mitjà de canals d'anions i produir altres radicals lliures molt més reactius, com el radical hidroxil ($\bullet OH$) i el radical perhidroxil (HO_2^-), per exemple (Axelrod i col·ls., *Plast Reconst Surg*, 1990).
- El radical hidroxil, $\bullet OH$, és el resultat de la descomposició de l'aigua oxigenada (H_2O_2). Està format a partir del radical superòxid i és encara més reactiu que el primer i amb una vida més curta. La formació dels radicals hidroxils de l'aigua pot ser catalitzada per productes que continguin ferro, com la ferritina, l'hemoglobina o mioglobina. Igual que l'anió superòxid ($O_2^{\bullet -}$), és format per processos enzimàtics estimulats per aportacions energètiques, sobretot en forma de radiacions ultraviolades (UV), lumíniques o ionitzants.
- L'oxigen singulet, $^1\Delta O_2$, igualment molt agressiu, no és un RLLO, però sí que es tracta d'una molècula d'oxigen excitada, la qual, sota l'acció directa d'un quàntum d'energia, ha transferit un electró de l'òrbita interna a l'òrbita externa. Aquesta captació d'energia per la molècula d' O_2 modifica la seva configuració electrònica externa, cosa que condueix a dues formes particularment reactives, una de tipus radicalari i l'altra de tipus no radicalari, les quals, a causa de la seva relativament llarga vida mitjana, tenen un paper molt important en les oxidacions de microorganismes.

- I totes aquelles que van apareixent al llarg de la lipoperoxidació i que, atesa la seva naturalesa, esdevenen a la vegada radicals, per exemple els radicals acicloxil, acilperoxil i d'altres (Pré, *Pathol Biol*, 1991).

Les ERO tenen la particularitat de reaccionar amb relativa facilitat amb substrats endògens cel·lulars i ho fan també amb altres substrats exògens.

Un radical lliure és un fragment molecular amb un electró sol a la seva òrbita exterior, que provoca una oxidació molt alta, és inestable i reacciona instantàniament amb altres substàncies pròximes. La seva vida biològica mitjana és inferior a microsegons, però té la capacitat de reaccionar amb tot el que hi ha al seu voltant, cosa que provoca un gran dany a molècules i membranes cel·lulars. Aquestes reaccions poden produir una cascada de radicals lliures amb els efectes multiplicats, una autèntica reacció en cadena.

1.1.3. MECANISMES DE PRODUCCIÓ DELS RLLO I LES ERO:

L'**activació de l'oxigen** és produïda per una reducció monovalent, de la qual en resulta la formació de l'anió superòxid, el peròxid d'hidrogen, el radical hidroxil i finalment l'aigua. La primera reacció, que implica la formació de superòxid, és una reacció endotèrmica, mentre que la resta de reaccions són exotèrmiques.

El **superòxid** ($O_2^{\bullet -}$) pot actuar com a oxidant o com a reductor; pot oxidar sulfur, àcid ascòrbic o NADPH, o pot reduir el citocrom C i ions metàl·lics. Una reacció de dismutació duu a la formació de peròxid d'hidrogen i oxigen, bé espontàniament o bé per la catàlisi de l'enzim superòxid dismutasa (SOD). En el seu estat protonat ($pK_a=4,8$), el superòxid forma el radical perhidroxil, el qual és un potent oxidant, però la seva funció biològica és menor arran de la seva baixa concentració a pH fisiològic.

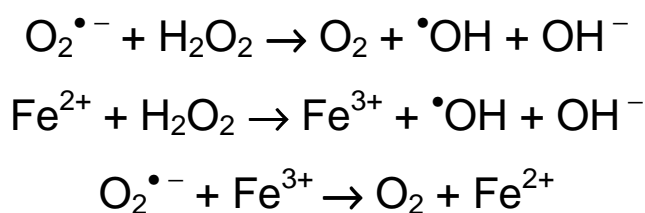
La reducció univalent del superòxid produeix **peròxid d'hidrogen** (H_2O_2), el qual no és un radical lliure, perquè tots els seus electrons estan aparellats. El peròxid d'hidrogen és permeable a través de les membranes de manera que no queda compartimentat a l'interior cel·lular. Nombrosos enzims, peroxidases, utilitzen el peròxid d'hidrogen com a substrat en reaccions d'oxidació implicades en la síntesi de complexes molècules orgàniques.

El peròxid d'hidrogen no té una reactivitat per si mateix, sinó que necessita la presència d'un metall reductor per formar **radical hidroxil** ($^{\bullet}OH$), el qual és l'agent oxidant més potent i reactiu dels que es coneixen. Fenton va descriure el potencial oxidatiu del peròxid d'hidrogen mesclat amb sals de ferro a finals del segle XIX.



En els sistemes biològics, la disponibilitat d'ions ferrosos marca el factor limitant, però com a conseqüència del reciclatge del ferro gràcies a un agent reductor –des d'ions fèrrics a ferrosos– és possible el manteniment d'una reacció de Fenton, de la qual en resulta la generació de radicals hidroxils (Pré, *Pathol Biol*, 1991).

Un agent reductor possible és el superòxid, el qual participa en la reacció global (la primera) que és la suma de les altres dues:

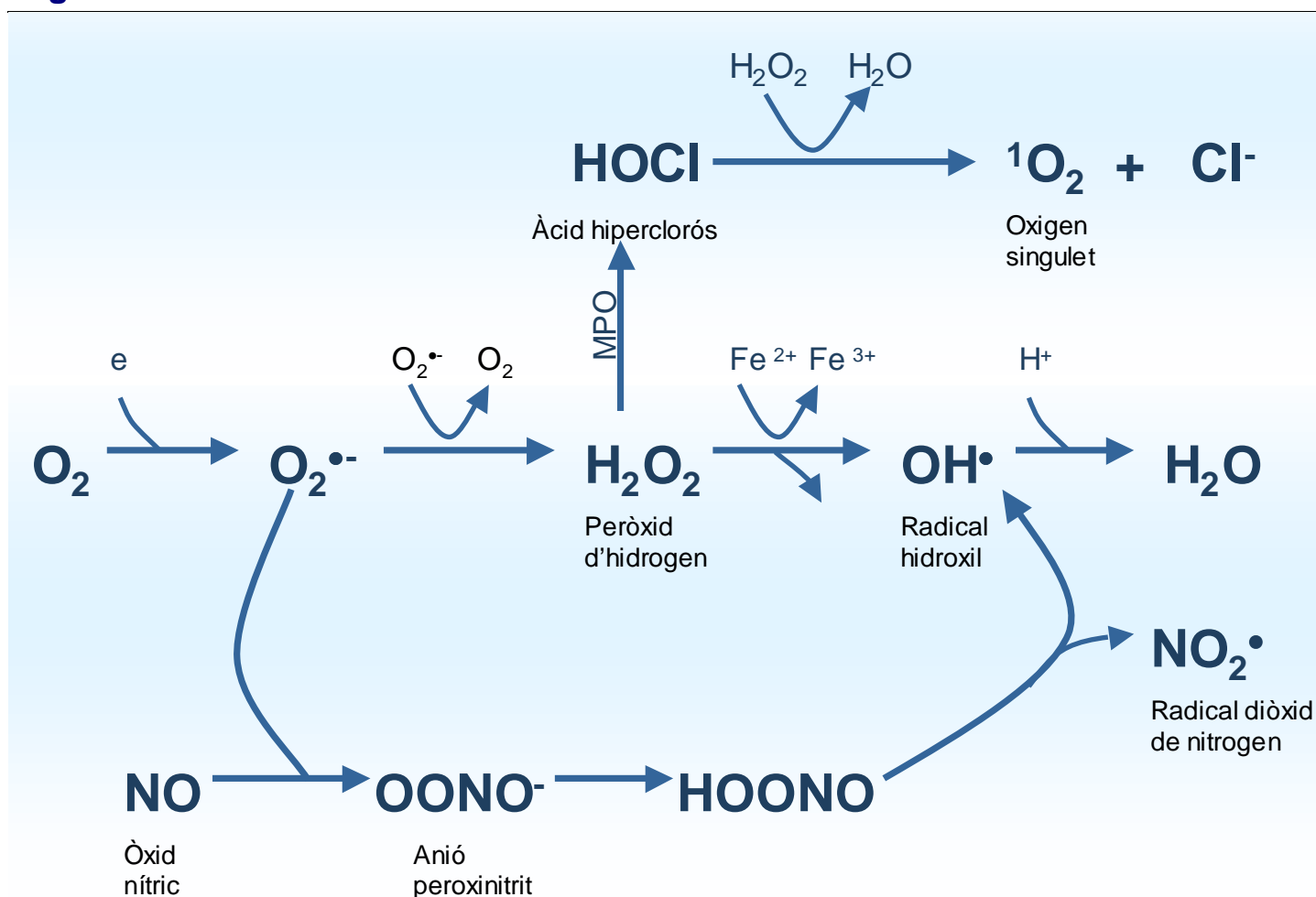


Així doncs, en presència de traces d'ions de ferro, la reacció del superòxid amb el peròxid d'hidrogen generarà els perillosos radicals hidroxils i, així, aquests radicals podran iniciar l'oxidació de substrats orgànics.

Els metabòlits d'O₂ tenen una vida molt curta, per exemple de l'ordre de 10⁻⁹ s per a l'·OH; altres metabòlits actius, com l'H₂O₂ són molt més estables (Kohen i col·ls., *Toxicol Pathol*, 2002)

Els radicals hidroxils es poden produir també a través d'una via Fe-independent a partir de l'òxid nítric (figura 2). Aquesta via també promou la formació del radical diòxid de nitrogen (NO_2^\bullet).

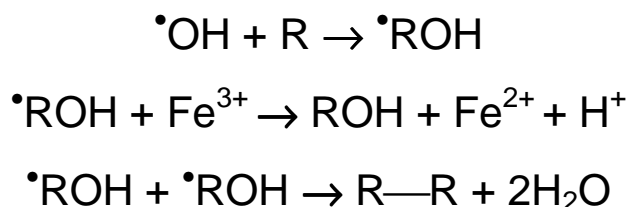
Figura 2. Vies de formació de les ERO



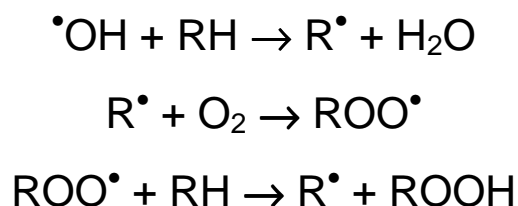
Extret de Benzie i col·ls., *Comp. Biochem. Physiol. A*, 2003

L'àcid hiperclorós és generat per l'enzim mieloperoxidasa (MPO) (l'MPO es troba en els neutròfils) a partir del peròxid d'hidrogen. Es tracta d'un potent oxidant que actua fisiològicament com a agent bactericida i patològicament com agent que promou la inflamació. (De Paulet, *Ann Biol Clin*, 1990).

L'oxidació dels substrats orgànics pot produir-se per dues vies possibles: addició de grups OH a la molècula orgànica, o bé eliminació d'un hidrogen. En la reacció d'addició, els radicals hidroxils s'afegeixen al substrat orgànic i formen un producte hidroxilat que serà posteriorment oxidat per ions fèrrics, oxigen o altres agents, per estabilitzar el producte. Els productes hidroxilats poden també "dismutar-se" i formar productes entrelligats o *crosslinked*.



En la reacció d'eliminació d'un hidrogen, el radical hidroxil oxida el substrat orgànic tot formant aigua i un radical orgànic. Aquest radical pot reaccionar amb l'oxigen, i aquesta reacció pot formar un radical peroxil que pot fàcilment eliminar un hidrogen d'una altra molècula orgànica, tot formant un segon radical orgànic.



Qualsevol substància, endògena o exògena, que pugui tenir reduccions podria formar un radical que després reacciona amb l'O₂ i genera O₂^{•-} (Halliwell, *Br J Exp Path*, 1989).

1.1.4. FONTS DE RLLO I D'ERO:

Les ERO poden tenir un origen tant endogen, de la pròpia cèl·lula, com exogen.

Entre les fonts endògenes destaquen:

- La cadena respiratòria, en què la reducció monovalent de la molècula d'oxigen dóna lloc a la formació de la majoria d'aquests compostos. Ha d'assenyalar-se que el 95 % de l'oxigen que respirem és reduït a H₂O per l'acció de la citocrom oxidasa-a-3, que correspon a l'últim pas de la cadena de transport electrònic. A més, a nivell del complex quinona-semiquinona-ubiquinol, l'O₂ actua com a acceptor d'electrons i dóna origen a la formació de radicals.
- Les cèl·lules fagocitàries (neutròfils, monòcits o macròfags), que utilitzen el sistema de la NADPH oxidasa i generen directament anió superòxid (O₂^{•-}). Per altra banda, com a mecanisme de defensa, aquestes cèl·lules també generen òxid nítric (NO[•]), per acció de l'òxid nítric sintasa sobre l'arginina. Per tant, les cèl·lules dotades de propietats fagocitàries, sota la influència d'estímuls bacterians o proinflamatoris, produeixen fisiològicament les ERO, que els permeten destruir els microorganismes. Al mateix temps, però, la formació d'ERO pot alterar altres molècules i contribuir als processos inflamatoris.

Els factors exògens que incrementen la producció d'espècies reactives de l'oxigen són els següents:

- Factors químics:
 - Augment dels metalls pesants, reaccions en presència de plom, ferro o coure tipus Fenton. El peròxid d'hidrogen, en presència de metalls produeix radical hidroxil, un dels més reactius i perillosos.
 - Components del fum del tabac com l'amoniac, el benzopirè, el cianur d'hidrogen, el diòxid i el monòxid de carboni, restes de plom o arsènic, etc.
 - Els inhibidors de sistemes defensius antioxidants, com l'azida, la hidroxilamina, l'aminotriazol, que inhibeixen les catalases (CAT), i l'àcid ditiocarbàmic, que inhibeix la superòxid dismutasa (SOD).
 - Fàrmacs que indueixen la proliferació de peroxisomes com el clofibrat, i fàrmacs antineoplàstics, en els quals l'eficàcia està lligada a la seva transformació en radical, tot causant el dany irreversible dels enzims, membranes i DNA de les cèl·lules tumorals (Pré, *Pathol Biol*, 1991; Dansen i col·ls., *IUBMB Life*, 2001).
 - Els agents actius sobre les membranes cel·lulars, que són importants sota el punt de vista de la carcinogènesi, entre els quals tenim lectines, teleodicina, mezerines, l'aflatoxina B1, el benzopirè, l'asbest i la sílice (Clemens i col·ls., *Biochim Biophys Acta*, 1980; Romero i col·ls., *Med Clin*, 1990).
 - Nombroses molècules estranyes a l'organisme són l'origen d'una producció indirecta d' $O_2^{\bullet -}$. Així, durant el metabolisme pulmonar, l'herbicida paraquat (PQ^{++}) és reduït per un enzim a una forma radicalària catiònica (PQ^+). La reoxidació en PQ^{++} per O_2 produeix importants

quantitats d' $O_2^{\bullet-}$, que poden generar posteriorment radicals $\bullet OH$, a través de la seva conversió en H_2O_2 , amb la qual cosa s'inicia una reacció de lipoperoxidació, responsable de la toxicitat pulmonar d'aquest herbicida (Pré, *Pathol Biol*, 1991).

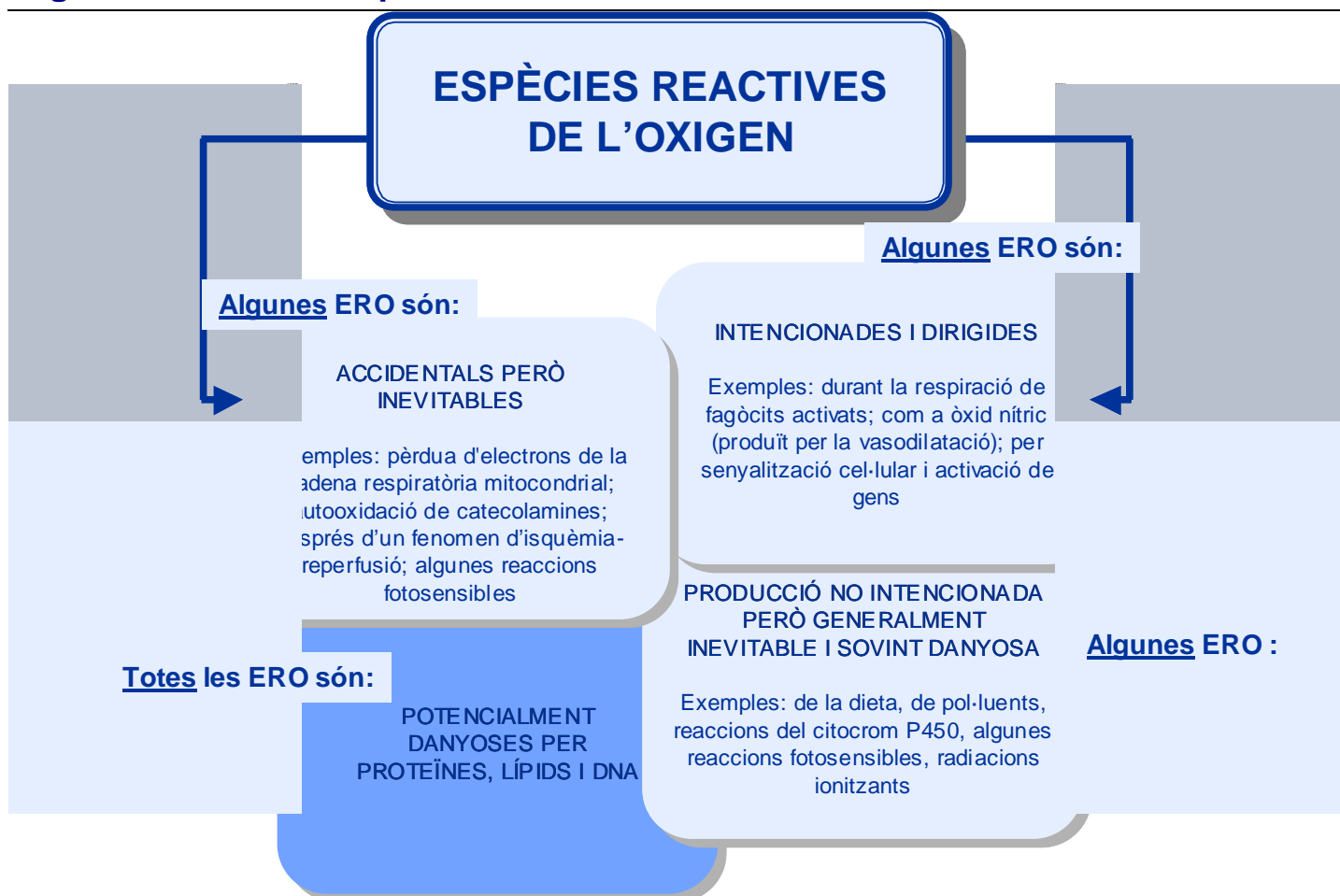
○ Factors físics:

- Les radiacions ultraviolades i les radiacions de l'espectre visible que intervenen com a quàntums d'energia a la pell i estimulen la formació de superòxids i d'oxigen singulet. El paper de les irradiacions còsmiques a la capa d'ozó atmosfèrica està igualment involucrada en la formació de radicals lliures, sobretot a la pell (Romero i col·ls., *Med Clin*, 1990).
- L'oxigen hiperbàric. Una pressió parcial elevada d'oxigen, per exemple, a nivell dels alvèols pulmonars, incrementa significativament la formació d' $O_2^{\bullet-}$. En aquest sentit, durant la recuperació dels estats anòxics, la reoxigenació sobtada i massiva d'un òrgan isquèmic [reperfusió] s'acompanya paradoxalment d'un agreujament del dany cel·lular [paradoxa de l'oxigen] que és, en efecte, la conseqüència d'una hiperoxidació d' $O_2^{\bullet-}$. Aquests processos han estat tots particularment estudiats en la isquèmia miocàrdica i intestinal (Maffei i col·ls., *Planta Med*, 1999).
- Les radiacions ionitzants, generades per les explosions atòmiques, provoquen la formació de grans quantitats d'ERO, que seran les responsables d'anomalies cromosòmiques lligades al seu efecte sobre el DNA.

- Factors orgànics i metabòlics:
 - Dieta hipercalòrica o dieta amb poc contingut en antioxidants.
 - Patologies com la diabetis, processos inflamatoris, traumatismes i isquèmia-reperfusió.
 - Exercici extenuant.

Les principals característiques de les ERO es resumeixen a la figura 3.

Figura 3. Característiques de les ERO



Extret de Benzie i col·ls., *Comp. Biochem. Physiol. A*, 2003

És paradoxal el fet que la vida en el planeta depèn de l'oxigen, però aquest mateix element, en condicions adverses, esdevé un poderós oxidant que allibera espècies reactives d'oxigen.

En aquest treball, es valoren les conseqüències, des del punt de vista fisiopatològic, que aquestes molècules tenen sobre l'ésser humà.

1.2. SISTEMES ANTIOXIDANTS

Com hem vist fins ara, la producció d'ERO és un fenomen natural, dinàmic i continu. El dany que aquests compostos poden provocar depèn d'un delicat equilibri amb els sistemes antioxidants que protegeixen les cèl·lules del nostre organisme.

Un antioxidant es pot definir com qualsevol molècula capaç d'inhibir o prevenir l'oxidació d'un substrat susceptible (Benzie, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2003). Els nivells d'antioxidants s'utilitzen com a biomarcadors del distrès oxidatiu ja que tenen un temps de vida mitjana més llarg que els radicals lliures, que són molt més difícils de quantificar.

Els mecanismes de defensa per neutralitzar les ERO són múltiples i variats i es poden dividir en dos grups segons la seva **naturalesa**:

- **Enzimàtics**: Es tracta d'enzims amb capacitat antioxidant, que no es consumeixen en reaccionar amb les ERO, i són dependents de certs cofactors, generalment metalls, com el coure, el ferro, el magnesi, el zinc o el seleni. Els enzims antioxidants més importants són la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatió reductasa (GR) i la glutatió peroxidasa (GPx). Aquests enzims representen la primera barrera per a la producció d'ERO.

La **SOD**, descoberta a finals dels anys seixanta (McCord i col·ls., *J Biol Chem*, 1969), catalitza la transformació del radical superòxid en peròxid d'hidrogen, que pot ser alhora transformat, gràcies a la **CAT**, en aigua i oxigen molecular. Encara que l'anió superòxid, com ja hem vist, no és per si mateix particularment reactiu,

pot reduir metalls de transició, com el ferro, i així convertir-se en un dels radicals més potents com és el radical hidroxil. Per això és important l'eliminació del superòxid.

La **GR** és un enzim que catalitza la reducció del glutatió oxidat a glutatió reduït, el qual serà utilitzat per la GPx.

La **GPx** redueix peròxids lipídics (ROOH), formats durant l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats (PUFA, de l'anglès *polyunsaturated fatty acids*), en una molècula d'àcid gras hidroxil (ROH), que és no tòxica i és estable. Juntament amb les fosfolipases, la GPx també pot convertir els hidroperòxids fosfolipídics (L-OOH) en hidròxids fosfolipídics (L-OH) (Ursini i col·ls., *Biochim Biophys Acta*, 1982; Van Kuijk i col·ls., *Trends in Biochem Sci*, 1987).

- No enzimàtics: elements principalment exògens, responsables de la capacitat antioxidant dels fluids biològics. Aquests compostos, a diferència dels enzims, es consumeixen durant la seva acció antioxidant, motiu pel qual han de ser reemplaçats. Provenen principalment de la dieta a través de les aportacions de vitamina E, vitamina C, betacarotens, polifenols, flavonoides i oligoelements. A més, hi ha alguns components d'origen endogen com el glutatió (GSH), l'urat, l'ubiquinol, la melatonina i algunes proteïnes plasmàtiques que també exerceixen un rol protector.

Segons l'estructura química, els antioxidants no enzimàtics podem classificar-los en:

- ° Proteïnes d'alt pes molecular: albúmina, ceruloplasmina, transferrina i haptoglobulina. Són presents en el plasma i s'uneixen a metalls per reduir la possibilitat de producció de radicals lliures catalitzats per metalls (Halliwell i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 1989). L'albúmina i la ceruloplasmina poden unir ions de coure, i la transferrina pot unir ferro lliure. L'haptoglobina s'uneix a proteïnes que contenen grup hemo i pot, fins i tot, treure-les de la circulació. Tant les proteïnes lliures com les associades a grup hemo, tenen propietats antioxidants arran de la reacció amb el peròxid d'hidrogen, cosa que evita fàcilment la peroxidació lipídica (Kanner i col·ls., *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1987).
- ° Antioxidants de baix pes molecular: els podem dividir en antioxidants solubles, lípids (tocoferol, carotens, quinones, bilirubina i alguns polifenols) i antioxidants solubles en aigua (àcid ascòrbic, àcid úric i alguns polifenols). El glutatió (GSH), la vitamina C (àcid ascòrbic), la melatonina i l'àcid úric són els més importants, ja que a més de ser potents antioxidants tenen també un efecte sinèrgic amb altres antioxidants. L'àcid úric es forma durant el metabolisme de les purines i presenta també una gran capacitat antioxidant sobre els radicals lliures en la fase aquosa. El **GSH** és un antioxidant molt important tant a l'interior de la cèl·lula com al compartiment extracel·lular. Les característiques del GSH i de la mateixa molècula quan s'oxida (GSSG) es detallen més endavant. Aquestes molècules tenen la capacitat de retardar o inhibir el dany cel·lular.

Segons el **mecanisme d'acció** dels antioxidants, els podem classificar d'aquesta manera:

- Un primer mecanisme pot ser el que trenca la cadena de formació de radicals lliures: l'antioxidant dóna un electró al RLLLO present en el sistema. Un exemple és la neutralització dels radicals lipídics.
- El segon mecanisme implica l'eliminació dels radicals lliures mitjançant antioxidants secundaris que esmorteixen la catalització de la reacció en cadena dels radicals lliures.

No s'ha d'oblidar que alguns antioxidants també poden tenir efectes sobre la expressió gènica directament o indirectament (Vaya i col·ls., *Curr Med Chem*, 2001). Un cert nombre de gens es regulen per canvis en l'estat d'oxidoreducció cel·lular (Allen i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2000). I aquest estat depèn, entre altres coses, del balanç prooxidant-antioxidant en els teixits i la sang, i també del tipus i nivell dels antioxidants presents. Per exemple, els antioxidants fenòlics poden induir l'RNA missatger c-fos i c-jun mitjançant l'acció d'un element de resposta antioxidant (ARE), que és específic i dosidependent.

Segons el **lloc d'acció** hi haurà diferent grau de defensa contra processos radicalaris:

- En el medi intracel·lular la protecció està assegurada per:
 - Enzims citosòlics que catalitzen l'eliminació d' $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2 , amb la qual cosa es redueix al màxim la formació de $\bullet OH$.
 - Molècules amb capacitat de fixar i destruir radicals lliures: els *scavengers* (netejadors) i els neutralitzants de l'oxigen singlet o *quenchers* (amortidors). Els *scavengers* tenen la propietat de bloquejar i destruir els radicals lliures oxigenats, destruint-se o modificant-se ells mateixos. Els *quenchers* estan implicats en la protecció contra els processos radicalaris de peroxidació lipídica.
- El compartiment extracel·lular només disposa de febles mitjans de protecció. En zones inflamatòries, els seus constituents estan plenament exposats al flux d' $O_2^{\bullet -}$ i H_2O_2 provinent dels fagòcits actius. *Scavengers* i *quenchers* participen poc en la defensa extracel·lular. En el plasma, sembla admès que els antioxidants que actuen són principalment la vitamina C, l'urat, l' α -tocoferol i l'albumina, per ordre decreixent d'eficàcia.

Per prevenir la creació descontrolada de les ERO, les cèl·lules tenen una gran varietat de sistemes de control antioxidant. Els antioxidants regulen les reaccions desitjades i necessàries dels radicals lliures i els eliminen o neutralitzen quan són perillosos.

En els éssers humans, la dieta és la font més important d'antioxidants ja que la protecció endògena resultaria insuficient per eliminar els efectes de la constant i inevitable formació de les ERO. Per tant, l'estudi d'algunes molècules com l' α -tocoferol, l'àcid ascòrbic, els carotenoides i els flavonoides o, més recentment, la melatonina han ocupat molts dels treballs realitzats fins al moment (per exemple: Tomás-Zapico i col·ls., *J Pineal Res*, 2005).

En termes evolutius, podem dir que l'ésser humà ha estat cada cop més exposat a l'oxigen: des del 15 % de fa uns 250 milions d'anys fins al 21 % d'oxigen en l'atmosfera actual; i la ingesta d'antioxidants ha estat cada vegada menor. L'augment del contacte amb aquesta molècula ha permès al nostre organisme augmentar l'eficiència d'algunes vies de catabolisme aeròbic. No obstant, tal com hem dit anteriorment, la toxicitat de l'oxigen també fa que les espècies reactives i els radicals lliures d'oxigen siguin més abundants en l'actualitat (Benzie, *Comp Biochem Physiol*, 2003).

Les dietes riques en antioxidants han demostrat ser mecanismes eficients de prevenció d'algunes malalties com l'arteriosclerosi o el càncer (Kiely i col·ls., *Public Health Nutr*, 2001). Per aquest motiu les dosis diàries recomanades de diferents antioxidants sempre són recomanacions d'ingesta mínima però no màxima.

Així com l'eficàcia dels antioxidants en matèria de prevenció d'algunes malalties és un fet demostrat àmpliament, la utilització com a mètode terapèutic és més discutida (Kaliora i col·ls., *Atherosclerosis*, 2006; Lewis, *Heart Lung Circ*, 2004). Molts estudis veuen una millora de la patologia gràcies a una teràpia antioxidant (Rodrigo i col·ls., *Pharmacol Ther*, 2005), però d'altres no perceben aquesta millora. Per exemple, la

hiperglicèmia està relacionada amb l'augment de la producció de superòxid, però els estudis que utilitzen antioxidants clàssics, com la vitamina E, no obtenen efectes beneficiosos. Aquests antioxidants només netegen els radicals existents, no obstant, la producció excessiva del radical superòxid porta també a activar altres vies d'oxidació i producció de radicals lliures i a l'augment de l'òxid nítric, que afavoreix la formació de peroxinitrit, que és un dels radicals lliures responsables del dany al DNA (Ceriello, *Diabetes Care*, 2003). Per aquest motiu, la teràpia antioxidant ha de tenir en compte el tipus de radicals que es formen en cada malaltia i els sistemes que són afectats per l'oxidació.

El futur de la teràpia antioxidant és tenir antioxidants de síntesi capaços d'actuar en els diferents nivells on té lloc l'oxidació i el dany de radicals lliures, en els casos on hi ha patologia diagnosticada (Day, *Drug Discov Today*, 2004) i promoure una dieta rica en vitamina C, carotenoides, vitamina E, polifenols i altres antioxidants alimentaris en la població general per afavorir la prevenció de determinades malalties.

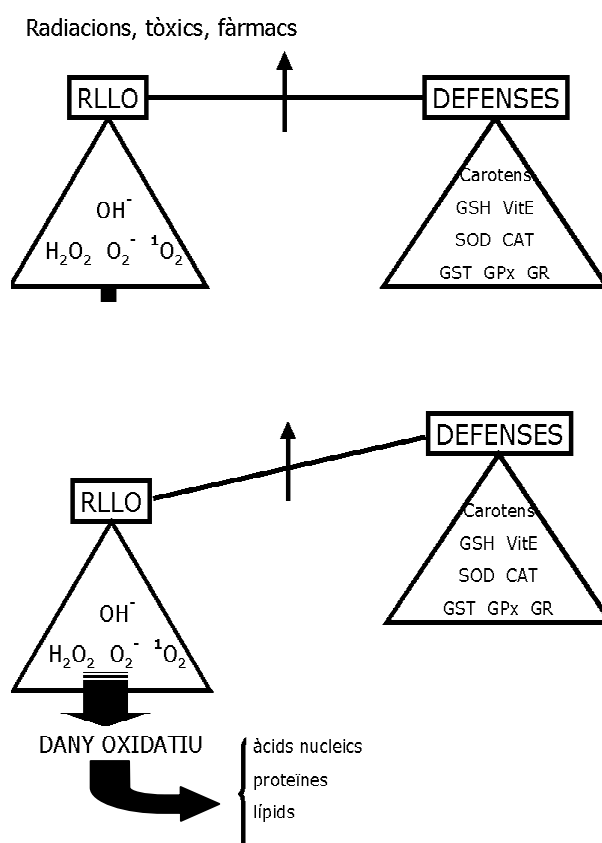
2. EL DISTRÈS OXIDATIU

Tal com hem vist, existeix una producció necessària i inevitable de radicals lliures d'oxigen en el nostre cos. Així mateix també hi ha mecanismes per aturar-ne l'efecte negatiu sobre les diferents estructures. El balanç entre producció i eliminació dels RLLO és el que determinarà, doncs, l'estat general de l'individu en aquest sentit. El que ens dóna una idea sobre aquest estat és, per una banda, la quantitat de radicals lliures existents i, per l'altra, la quantitat i la qualitat dels enzims i altres substàncies antioxidants que s'encarreguen de neutralitzar els electrons desaparellats.

Podem trobar-nos, doncs, amb diverses situacions. L'equilibri es pot donar sempre que el nivell de formació dels radicals lliures sigui equiparable al nivell de neutralització d'aquests radicals. És a dir, encara que l'agressió radicalària augmenti, si els sistemes defensius responen de la mateixa manera, es manté l'equilibri de la balança. El desequilibri, que té com a conseqüència un augment del dany de tipus radicalari, és el resultat de dues situacions diferents. En primer lloc, si augmenta l'agressió per part dels radicals lliures però els sistemes de defensa, tot i estar en situació normal, no poden neutralitzar-los en la seva totalitat, hi haurà dany oxidatiu. En segon lloc, encara que els nivells de formació de RLLO siguin els esperats, si els antioxidants es troben disminuïts respecte a la normalitat, també hi haurà un desequilibri a favor del dany oxidatiu i, per tant, ens trobem en un estat d'estrès.

El següent esquema (figura 4) representa la balança de producció i eliminació de RLLO i el possible desequilibri indicador d'estrès oxidatiu:

Figura 4. Balança prooxidant-antioxidant



Balança prooxidant-antioxidant en situació d'equilibri (a dalt) i desequilibri a favor del dany oxidatiu (a baix).

Parlem, però, en el nostre treball, de distrès oxidatiu, ja que la balança presentada també es pot decantar de manera oposada als desequilibris explicats fins ara. És a dir, l'individu pot trobar-se en un estat antioxidant quan, essent normals els nivells de formació d'ERO, tingui les defenses augmentades en relació a aquests ERO. Aquest mateix estat també es produeix quan, comptant amb els sistemes antioxidants en situació normal, la formació de radicals sigui menor a l'esperada.

Segons això, existeixen tres tipus de situacions del balanç oxidatiu:

- Estat d'**equilibri oxidatiu**: el sistema antioxidant de l'individu és capaç d'eliminar les ERO que produeix.
- Estat d'**estrès oxidatiu**: el sistema antioxidant de l'individu no pot eliminar les ERO totalment i es produeix dany oxidatiu.
- Estat de **repòs oxidatiu**: el sistema antioxidant de l'individu elimina les ERO en la seva totalitat i, a més, podria protegir-se sense problemes d'un atac d'ERO encara més gran.

La situació, en termes d'oxidació, d'un individu en un moment determinat pot ser el reflex de l'estat de la malaltia que li ha estat diagnosticada, o pot indicar també el risc de patir un dels molts desordres i malalties que són producte d'un estrès oxidatiu. No obstant, és molt difícil poder determinar l'estat de la balança prooxidant-antioxidant ja que hi ha una gran diversitat d'ERO que poden afectar a tots els nivells cel·lulars. De la mateixa manera, els tipus i ubicacions dels antioxidants que es coneixen també és molt variat i, a més, les ERO i els antioxidants es comporten de maneres diferents depenent de l'estat fisiopatològic de l'individu. Per això alguns autors intenten trobar aquells biomarcadors que millor informen de l'estat del balanç oxidatiu (Dotan i col·ls., *Prog Lipid Res*, 2004; Argüelles, *Biochim Biophys Acta*, 2004).

2.1. EL DANY OXIDATIU: LÍPIDS, PROTEÏNES I DNA

Els mecanismes d'acció que utilitzen les espècies reactives de l'oxigen i els RLLO per produir l'oxidació sobre els lípids de membrana, les proteïnes i el DNA, es detallen a continuació.

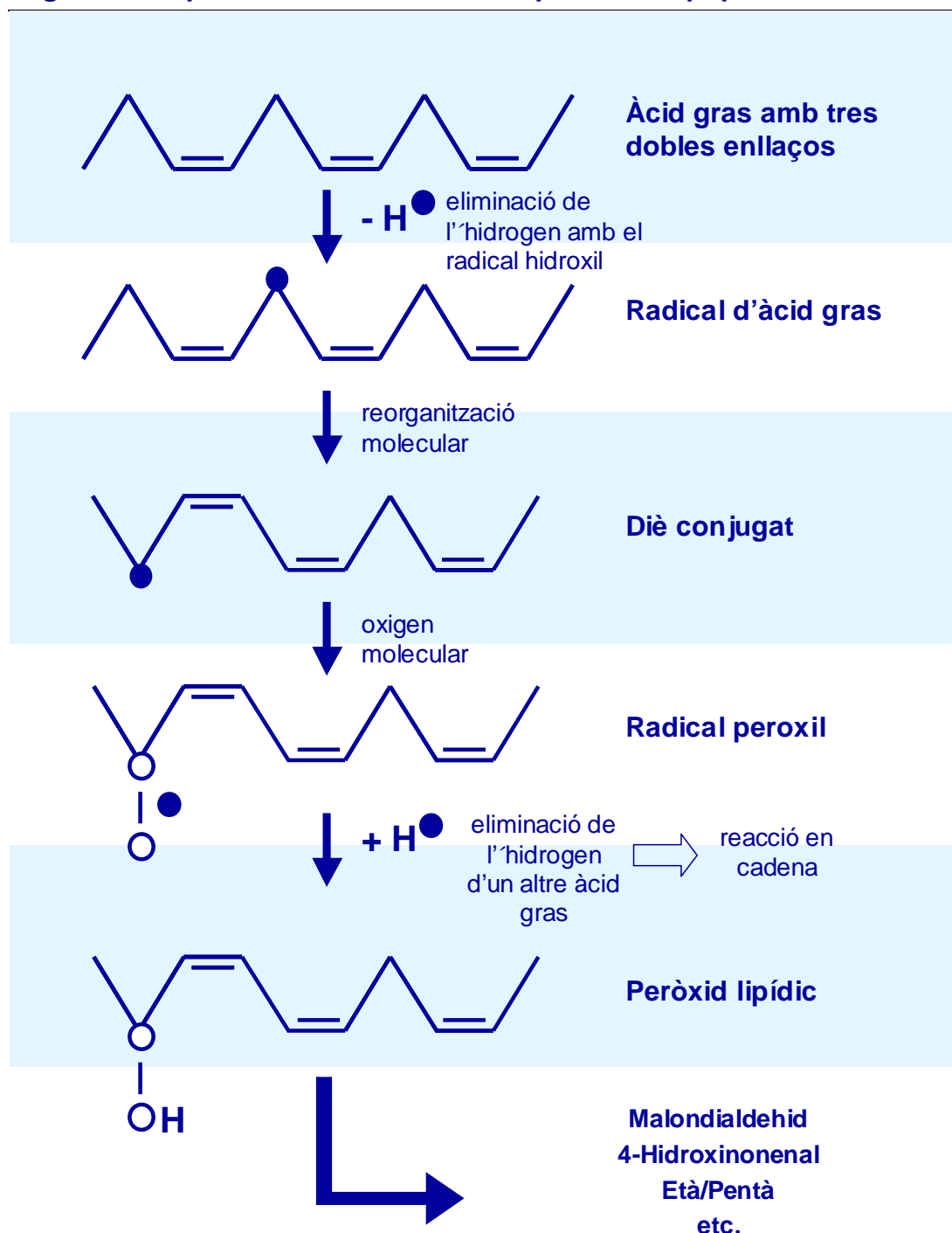
2.1.1. DANY OXIDATIU ALS LÍPIDS

La reacció d'eliminar un àtom d'hidrogen de les cadenes alquíliques dels PUFA s'anomena peroxidació lipídica, i genera la formació de radicals peroxil (ROO^{\bullet}), així com altres productes, d'entre els quals els aldehids, com el malondialdehid, i hidrocarburs, com l'età i l'etilè.

La lipoperoxidació es produeix constantment. És un procés que es pot desenvolupar amb l'ajut d'enzims o també de forma espontània, com a resultat d'un encadenament de reaccions de tipus radicalari (figura 5).

Els radicals lliures ataquen sobretot a nivell dels dobles enllaços de les cadenes hidrofòbiques dels fosfolípids que formen part de l'estructura de les membranes biològiques (però també poden atacar a nivell de l'enllaç èster entre el glicerol i l'àcid gras). Així, els radicals eliminen un àtom d'hidrogen dels àcids grassos poliinsaturats o PUFA que formen la porció hidrofòbica dels fosfolípids de les membranes.

Figura 5. Seqüència de reaccions bàsiques en la lipoperoxidació.



Extret de Young i col·ls., *Biochem. Soc T*, 2001

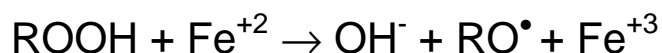
La peroxidació dels lípids implica tres etapes diferents:

- **Iniciació:** la reacció d'iniciació implica la subtracció d'un àtom d'hidrogen, amb l'ajut d'una espècie de tipus radicalari, i la creació d'un radical d'àcid gras. L'iniciador pot ser qualsevol molècula suficientment reactiva per extreure un àtom d'hidrogen d'un radical metilè [-CH₂-] d'un PUFA. Així, es produeix la captació de l'hidrogen per l'iniciador i la formació d'un radical orgànic, R[•], mitjançant la dissociació de l'energia de l'enllaç al·lílic al PUFA (Minotti i col·ls., *Lipids*, 1992). La iniciació es pot produir en qualsevol lloc de la cadena del PUFA. L'iniciador més destacat és el radical hidroxil ([•]OH) (Minotti i col·ls., *Chem Phys Lipids*, 1987). Contràriament, el radical superòxid (O₂^{•-}) no és suficientment reactiu per funcionar com a iniciador; a més, la seva càrrega li impedeix entrar a les membranes de naturalesa lipofílica. No obstant, la forma protonada d'aquest anió (HO₂[•]) és més reactiva i, no només pot actuar com a iniciador, sinó que es creu que també pot danyar les membranes per si mateix (Halliwell i col·ls., *Arch Biochem Biophys*, 1990). Alguns estudis qüestionen el paper de l'[•]OH com a iniciador de la peroxidació lipídica ja que és un agent oxidant inespecífic que reacciona amb tot tipus de molècules. En canvi, la peroxidació lipídica és un fenomen de localització molt específica (Ryan i col·ls., *Crit Rev Toxicol*, 1992). Per aquest motiu, s'ha descrit una teoria alternativa que proposa el ferro com a possible iniciador i que formaria un complex amb l'oxigen.

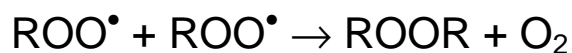
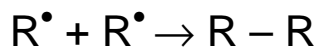
Així, s'apunta la possible existència d'espècies com els radicals perferril, ferril, o altres complexes formats per ferro i oxigen. També s'ha demostrat que altres metalls com el plom o l'alumini poden iniciar la peroxidació lipídica (Aruoma, *Biochem J*, 1989). Les dues teories han estat defensades i rebatudes per diferents autors sense poder concloure quin és el vertader iniciador del procés peroxidatiu.

- **Propagació:** en les reaccions de propagació, aquest radical d'àcid gras reacciona amb l'oxigen molecular i, d'aquesta manera es forma un radical peroxil. El radical peroxil actua eliminant un àtom d'hidrogen d'un segon àcid gras formant, així, un altre radical lliure que pot participar en una altra reacció d'eliminació d'un àtom d'hidrogen, és a dir, es propaga l'acció.

En presència de Fe o de qualsevol altre ió metàl·lic, la reacció en cadena no només es propaga sinó que també es veu amplificada, ja que la forma alquilperoxil (LOO^\bullet) és inestable en presència de Fe, i aquest radical orgànic pot participar en una reacció de Fenton, amb la consegüent generació de radicals alcoxi.



- **Terminació:** les reaccions de peroxidació en les membranes lipídiques acaben quan els carbonis o els radicals peroxils s'entrelliguen i formen productes conjugats que ja no són radicals.



Al llarg de la fase d'aturada intervenen els captadors fisiològics de radicals (*scavengers*).

La peroxidació lipídica o lipoperoxidació és una reacció autocatalítica en què les espècies reactives de l'oxigen o radicals lliures sostrauen àtoms d'hidrogen a les molècules d'àcids grassos poliinsaturats. La reacció acaba quan dues molècules de peròxids xoquen entre si o quan reaccionen amb algun antioxidant disponible. El ferro pot tenir un paper catalitzador tant en la fase d'iniciació com en la de propagació.

2.1.2. DANY OXIDATIU A LES PROTEÏNES

Les proteïnes i els àcids nucleics semblen ser menys susceptibles que els lípids a l'atac dels radicals lliures. El dany per atzar dels radicals lliures a proteïnes és poc probable: només si els radicals lliures s'acumulen –cosa que no és normal en una cèl·lula sana– o si el dany va dirigit a un lloc concret de la proteïna, es produeix aquest dany. Si una proteïna es troba lligada a un metall de transició, els radicals lliures li poden provocar un dany amb més facilitat. (Marx i col·ls., *Biochem J*, 1986; Stadtman i col·ls., *J Biol Chem*, 1991).

Les proteïnes són danyades amb l'oxidació d'una zona del residu aminoàcid enganxat a un grup hidroxil, que altera l'estructura de la proteïna i la danya. La majoria d'aquestes proteïnes són eliminades ràpidament per enzims proteolítics presents a la cèl·lula. Els canvis en l'estructura de les proteïnes també poden ser causats per la producció d'errors en la síntesi d'aquestes proteïnes, i l'origen dels errors pot ser als radicals lliures. Aquesta nova estructura molecular alterada pot provocar la pèrdua de funcionalitat de la proteïna i iniciar una cadena d'alteracions en el funcionament del metabolisme cel·lular.

En les ferides d'individus amb edat avançada, per exemple, s'ha observat una disminució de la capacitat de cicatrització. L'envelliment determina una disminució dels inhibidors 1 i 2 de metaloproteïnases de la matriu (MMPs). En aquest sentit, s'ha plantejat que el dany oxidatiu a aquests inhibidors de naturalesa proteica condicionaria la pèrdua de la seva activitat, amb el consegüent increment de l'activitat proteolítica de les metaloproteinases i l'aturada dels processos de cicatrització (Ashcroft i col·ls., *Pathology*, 1997).

El grau d'afectació de la cèl·lula per l'atac dels radicals lliures a proteïnes pot ser molt ampli, així, si l'organisme no respon de manera adequada, i tenint en compte que les proteïnes regulen multitud de funcions, els radicals lliures poden catalitzar l'aparició de patologies greus o empitjorar l'estat d'un individu en determinades situacions (Anderson i col·ls., *Med Hypotheses*, 1999).

2.1.3. DANY OXIDATIU AL DNA

Els radicals lliures d'oxigen formats en llocs propers al DNA cel·lular l'ataquen ràpidament com s'ha demostrat clarament en el cas de les radiacions. El DNA és, doncs, un lloc important i vulnerable a l'acció dels radicals lliures d'oxigen. Tot i així, com en el cas de les proteïnes, la possibilitat d'una reacció en cadena és molt menor que la que hi ha quan el blanc són els lípids de membrana. A més, perquè es produeixi una mutació en el material genètic caldrà que els radicals lliures d'oxigen actuïn sobre un lloc específic d'unió, i que el sistema de reparació del DNA, que es posa en funcionament durant la replicació, passi per alt la modificació que han provocat (Cheeseman i col·ls., *Br Med Bull*, 1993).

Són sobretot els radicals lliures hidroxils ($\cdot\text{OH}$) els que ataquen qualsevol de les posicions del sucre desoxiribosa, i provoquen trencaments d'una o de les dues cadenes del DNA. Els radicals hidroxils també desaminen nucleòtids i desencadenen mutacions puntuals o canvis en els parells de bases, transicions i transversions.

L' $\bullet\text{OH}$ quan ataca la timina produeix la timina glicol, i l'atac de la guanina dóna lloc a la 8-hidroxi-guanina. Aquests productes del DNA són eliminats per enzims de reparació com les glicolases i són excretats per l'orina com a base lliure o com a derivats nucleòtids, timidina glicol i 8-hidroxi-deoxi-guanosina (8-OhDG). Aquests productes finals poden ser usats per determinar el grau d'atac dels radicals lliures al DNA (Cathcart i col·ls., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984).

En la mitocondria, el dany al DNA provocat pels RLLO n'accelera la degradació. L'acumulació de mutacions en gens codificadors de transportadors d'electrons (NADH deshidrogenasa, citocroms i coenzim Q) fa disminuir l'eficiència del transport, que, a la vegada, augmenta la producció de radicals lliures hidroxils.

Les mutacions acumulades al DNA, producte de l'atac de radicals lliures, han estat relacionades amb l'envelliment i amb patologies prevalents entre les quals hi ha el càncer, l'Alzheimer o la diabetis (Van Houten, *DNA Repair* (Amst), 2006).

3. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU

La mesura de l'estat oxidatiu en humans ha estat, com hem dit, motiu de preocupació durant molts anys, per això, actualment existeixen més de 40 índexs per calcular aquest paràmetre. Un índex és el valor que dóna com a resultat algun assaig, per exemple: la concentració d'una molècula, l'activitat d'un enzim, la capacitat d'una mostra per eliminar RLLO, etc. El nombre de mètodes existents s'eleva a més de cent, ja que un índex pot ser mesurat per diferents mètodes, per exemple: la concentració de malondialdehid es pot mesurar pel mètode anomenat TBARS [substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric] però també es pot dur a terme mitjançant HPLC [cromatografia de líquids d'alta resolució] (Dotan i col·ls., *Prog Lipid Res*, 2004).

Les ERO són capaces de reaccionar amb gairebé qualsevol tipus de molècula orgànica, tant lípids, proteïnes com àcids nucleics. Aquest fet s'ha hagut de tenir en compte a l'hora de dissenyar els mètodes de valoració de l'estat oxidatiu dels individus. El dany oxidatiu a les membranes es pot mesurar, per exemple, valorant la quantitat d'hidroxinonenal, el dany a les proteïnes detectant els productes de la carbonilació i el dany al DNA amb mètodes indirectes com ara la mesura de la 8-hidroxideoxiguanosina.

Els radicals lliures són àtoms o molècules que tenen energia de fàcil alliberament, en entregar-la, provoquen reaccions químiques en cadena en les cèl·lules i teixits. Aquestes reaccions poden determinar un dany o alteració orgànica, a vegades irreversible, que es pot mesurar mitjançant múltiples mètodes.

3.1. BIOMARCADORS DE L'ESTAT OXIDATIU

En els últims anys s'ha intentat buscar un biomarcador d'estrès oxidatiu universal, és a dir, que es pugui utilitzar en qualsevol context, que sigui comparable entre individus i informatiu del seu estat fisiopatològic. No obstant això, cada cop pren més força la creença que no és possible mesurar l'estat d'oxidació general si no es fa amb múltiples biomarcadors (Dotan i col·ls., *Prog Lipid Res*, 2004; Abuja i col·ls., *Clin Chim Acta*, 2001).

Dotan i col van proposar el 2004 un criteri de classificació dels diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu en tres categories (figura 6):

- Mètodes basats en la mesura de les concentracions dels productes d'oxidació de lípids, proteïnes i DNA, així com les concentracions d'antioxidants (PRODUCTES DE L'ESTRÈS OXIDATIU)
- Mètodes que valoren l'oxidabilitat de les estructures exposades a una font de radicals lliures (SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ)
- Mètodes per valorar la capacitat antioxidant dels líquids biològics (CAPACITAT ANTIOXIDANT)

Figura 6. Principals biomarcadors del distrès oxidatiu

BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU	Productes de l'estrès oxidatiu	Promotors	Producció de RLLO ESR Luminol	
		Inhibidors	Antioxidants de baix pes molecular: Vitamina C i E Àcid Úric Carotens GSH	Enzims i macromolècules: SOD CAT GR GPx GST
		Productes de la peroxidació	Peroxidació lipídica: MDA Diens conjugats	Peroxidació proteïnes: Proteïnes carbonilades
	Susceptibilitat d'oxidació	Resistència dels lípids: Hemòlisi		
	Capacitat antioxidant	Radicals atrapats totals (TRAP) Capacitat antioxidant dels RLLO (ORAC)		Capacitat antioxidant relativa al trolox (TEAC) Poder reductor anioxidant del ferro (FRAP)

Classificació dels principals biomarcadors del distrès oxidatiu, adaptat de Dotan i col·ls., *Prog Lipid Res*, 2004

La valoració del distrès oxidatiu d'un individu podria ser, doncs, resultat de la quantitat de molècules que ha generat l'atac de radicals lliures, de la susceptibilitat dels components oxidables i de la capacitat del cos per fer front a l'oxidació radicalària. Segons Dotan, conèixer aquests tres paràmetres és indispensable per valorar correctament l'estat oxidatiu d'un individu.

A la figura 6 hi ha una representació dels biomarcadors més importants de cada una de les categories metodològiques que es detallen a continuació.

3.1.1. PRODUCTES DE L'ESTRÈS OXIDATIU

En el procés d'oxidació hi intervenen els radicals lliures (promotors), els antioxidants (inhibidors) i les molècules que es formen conseqüència de la peroxidació (productes de la peroxidació).

3.1.1.1. PROMOTORS

La valoració de la concentració dels agents oxidants, els promotors, és una tècnica directa de mesura del distrès oxidatiu. No obstant i tal com s'ha comentat anteriorment, la seva quantificació és molt complicada ja que els radicals lliures tenen una vida mitja molt curta. Per exemple, el radical hidroxil té una vida mitjana aproximada de 10^{-9} s, que el fa gairebé indetectable amb la majoria de tècniques més comuns. Això ha creat la necessitat de desenvolupar noves tècniques detectar-lo o millorar les ja existents (Murrant i col·ls., *Microsc Res Tech*, 2001; Reiter i col·ls., *Cell*

Biochem Biophys, 2001; Halliwell i col·ls., *Free Radical Biol Med*, 1989). Les tècniques més destacades són: l'espectroscòpia de ressonància d'*spin* electrònic (de l'anglès ESR), les tècniques de radiòlisi i els assajos fluorimètrics i de cromatografia líquida d'alta pressió (de l'anglès HPLC). Majoritàriament, són tècniques molt cares i poc disponibles en els laboratoris de recerca biomèdica (Cheng i col·ls., *Anal Bioanal Chem*, 2003).

Els fonaments d'algunes de les tècniques més importants són els següents:

- La ESR capta el senyal emès per ressonància a una determinada freqüència, la senyal només es manifesta quan hi ha un electró desaparellat a la molècula, és a dir, detecta la presència de radicals lliures.
- El luminol és un compost químic que emet llum quan els radicals lliures l'oxiden. Es mesuren els fotons que emet el reactiu en ser oxidat.
- L'HPLC és un mètode físic de separació de molècules que introdueix altes pressions al sistema de cromatografia clàssic per aconseguir una separació de fases més acurada. Els radicals també es poden determinar avaluant amb l'HPLC els derivats estables que produeixen. Per exemple, el radical hidroxil produeix, en el salicilat, el derivat 2,3-dihidroxibenzonoic, aquesta és una molècula estable que es pot detectar en plasma, i així, tenim una idea de la producció del radical hidroxil en tot l'organisme (Dajas i col·ls., *Rev Med Uruguay*, 2004).

La complexitat i el cost de les tècniques que pretenen quantificar els radicals lliures fa que, per valorar els productes de l'estrès oxidatiu, en la majoria de treballs s'utilitzin altres biomarcadors (inhibidors de l'oxidació o productes de la peroxidació) més

senzills de quantificar i que també aporten informació sobre l'estat oxidatiu de l'individu.

3.1.1.2. INHIBIDORS

Els inhibidors de l'oxidació o antioxidants protegeixen l'individu i li eviten l'estrès oxidatiu. Com ja s'ha comentat, existeixen dos tipus de molècules que realitzen aquesta funció: els antioxidants de baix pes molecular i les macromolècules.

3.1.1.2.1 ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

Dins d'aquest grup trobem gran quantitat de molècules, les que s'utilitzen més comunament com a biomarcadors es mostren a la figura 6.

El **glutatió (GSH)** és una de les molècules antioxidants més importants i el biomarcador, d'aquesta categoria, que s'ha utilitzat en aquest treball.

El GSH és un tripèptid d'àcid glutàmic, cisteïna i glicina, i una de les molècules petites més abundants a la natura. La majoria de les seves funcions biològiques depenen del grup tiol del residu de cisteïna (Chasseaud, *Adv Cancer Res*, 1979).

Gairebé tots els teixits en tenen, encara que no necessàriament en totes les seves cèl·lules. Per exemple, n'hi ha al cervell però no a l'estroma neuronal, que ha de tenir alternatives per a la defensa antioxidant.

El GSH és sintetitzat majoritàriament al fetge, a partir de t-glutamilcisteïna i glicina, gràcies a l'enzim GSH sintasa.

Com ja hem dit, el glutatió reduït es manté en un cicle redox amb el GSSG (glutatió oxidat) dins el mitocondri i és regenerat per la glutatió reductasa (GR), un enzim citosòlic NADPH-dependent. En els eritròcits, que no tenen mitocondris, les alteracions en el metabolisme de la glucosa per la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa afectaran la disponibilitat de NADPH, i per tant es limitarà l'activitat reductasa.

Quan augmenta l'estrès oxidatiu, la capacitat del sistema GSH peroxidasa/GSH reductasa pot ser superada i produir-se un cúmul intracel·lular de GSSG. Per mantenir l'estat redox de la cèl·lula, el GSSG és transportat activament fora. Així doncs, el nivell de GSSG plasmàtic pot ser considerat un bon índex de l'estrès oxidatiu intracel·lular (Deleve i col·ls., *Semin Liver Dis*, 1990).

El glutatió té funcions com a reductor intracel·lular i juga un important paper en la catàlisi, el metabolisme i el transport cel·lular. Així, protegeix les cèl·lules davant radicals lliures, espècies reactives de l'oxigen i compostos tòxics d'origen endogen i exogen. És, per tant, a més d'una bona defensa davant de xenobiòtics electrofílics i oxidants intracel·lulars, un regulador del potencial redox cel·lular.

En la bibliografia es reflecteix la importància de valorar, no només el glutatió reduït, sinó també el glutatió oxidat, per tal d'establir la ràtio entre les dues molècules, que ens informa sobre el nivell d'oxidació en sang o en el teixit estudiat. La ràtio entre el glutatió oxidat i el reduït ens dóna una idea més clara de l'estat d'aquest sistema de detoxificació. Així, la biodisponibilitat de GSH és clau per evitar l'estrès oxidatiu o, el que és el mateix, un valor màxim en el quocient GSH/GSSG ens ofereix més garanties de protecció davant dels RLLO.

Atesa la importància del GSH com a antioxidant, mucolític i regulador de la inflamació, la resposta immune i la viabilitat cel·lular a través del seu estat redox en el cos humà, alguns autors hipotetitzen sobre la relació d'aquesta molècula amb algunes patologies, com ara la fibrosi quística, cosa que fa que es proposi una teràpia destinada a augmentar el glutatió (Bishop i col·ls., *Chest*, 2005).

Destaquem, doncs, dos punts clau en l'estudi del glutatió:

- En primer lloc, el GSH en sang elevat ha estat correlacionat, en humans, amb un bon estat de salut, i amb una vida mitjana llarga en ratolins. La qüestió és si en els individus malalts el glutatió decreix. Aquest fenomen s'ha pogut comprovar en diverses patologies cròniques com el càncer, que utilitza la ràtio GSSG/GSH per determinar l'estat de la malaltia i també com a marcador sistèmic de lesions canceroses, malalties genitourinàries, gastrointestinals, cardiovasculars i del múscul esquelètic. Algunes anèmies, com l'anèmia de Fanconi, es caracteritza perquè és deficient en la detoxificació de les ERO, cosa que implica una deficiència del sistema del glutatió, i comporta alteracions en el citoesquelet eritrocitari i, per tant, en la funcionalitat i integritat cel·lular. Un cop més, un paràmetre relacionat amb els radicals lliures, s'apunta com a bon indicador de la severitat i l'estat patològic de l'individu (Lang, *J Lab Clin Med*, 2000).
- En segon lloc, el glutatió reduït és l'antioxidant més potent del medi intracel·lular, i la ràtio GSSG/GSH serveix com a marcador de la capacitat antioxidativa cel·lular. La concentració d'aquesta molècula es pot incrementar amb l'administració de GSH, èsters de glutatió o precursors de GSH com la glutamina o la cisteïna. És a dir, es pot modular terapèuticament el metabolisme del

glutatió per millorar la simptomatologia de moltes patologies com la diabetis, la intoxicació, les malalties gàstriques, la urèmia, la sèpsia, els processos inflamatoris pulmonars caracteritzats per una menor capacitat de síntesi de GSH, les malalties coronàries, el càncer, per exemple el carcinoma renal on s'ha vist que el sistema antioxidant del glutatió té variacions segons els estadis de la malaltia, els tractaments llargs d'hemodiàlisi, les patologies neurodegeneratives com l'Alzheimer, i els estats d'immunodeficiència com el SIDA (Exner i col·ls., *Wien Klin Wochenschr*, 2000).

La **vitamina E** és un potent captador biològic de radicals, ja que la seva estructura li permet captar radicals lliures tant en la zona lipofílica com hidrofílica. La trobem a la membrana i al plasma. Té diverses formes isomèriques però la més important pel que fa a quantitat i acció és l' α -tocoferol. Interacciona amb la vitamina C, que es troba al citosol i regenera el tocoferol, ja que el lloc actiu de la vitamina E està enclavat en la cara interna de la membrana, i per tant es troba en contacte amb el citosol.

Estudis epidemiològics han demostrat que els malalts de càncer tenen concentracions sèriques baixes de vitamina E. També s'ha proposat que suplementes de vitamina E podrien inhibir la lipoperoxidació observada després de l'exercici físic (Fulbert i col·ls., *Pathol Biol*, 1992).

La **vitamina C** apareix com a un antioxidant que intervé en tots els òrgans, particularment en els de la visió. La riquesa de l'humor aquós en àcid ascòrbic (vitamina C) protegeix el cristal·lí contra els processos radicalars de l'envelliment que condueixen a la cataracta. La vitamina C pot estar reduïda o oxidada, i formar una espècie intermèdia de tipus radicalari que té capacitat de captar l'oxigen singulet i altres espècies de tipus radicalars. És així com protegeix a la pell de la toxicitat induïda pels raigs UV (McArdle i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2002).

La vitamina C pot comportar-se com a antioxidant però també com a prooxidant, ja que a concentracions altes pot ser un oxidant generador de radicals lliures com el $\bullet\text{OH}$ (Meves i col·ls., *J Invest Dermatol*, 2002)

L'**àcid úric** actua com a antioxidant fisiològic ja que és un *scavenger* de radicals oxigenats i quelant d'ions de metalls de transició (Becker, *Free Radic Biol Med*, 1993)

3.1.1.2.2 ENZIMS I MACROMOLÈCULES

Els enzims superòxid dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatió peroxidasa (GPx), glutatió reductasa (GR) i glutatió S-transferasa (GST) són els principals inhibidors de l'oxidació (figura 6). Tots s'utilitzen com a biomarcadors del dany oxidatiu en aquest treball ja que actuen a diferents nivells dins la xarxa de detoxificació de tipus radicalari.

La **família de les superòxid dismutases (SOD)** està formada per quatre metaloformes: dues contenen coure i zinc, una conté manganès i l'altra ferro.

En les cèl·lules procariotes hi ha els isoenzims de la Mn SOD i Fe SOD. A la taula II en resumim les característiques principals.

Taula II. Característiques principals dels isoenzims procariotes Mn i Fe de la SOD.

<u>Mn SOD</u>	<u>Fe SOD</u>
Matriu mitocondrial i molts bacteris	Bacteris aeròbics
PM= 40.000	PM= 39.000
	Conté un catió Fe^{3+} per molècula
Dues subunitats	Dues subunitats idèntiques
Enzim induïble	Enzim constitutiu

En les cèl·lules eucariotes hi ha els isoenzims de la CuZn SOD, Mn SOD i EC SOD (SOD extracel·lular). A la taula III s'en resumeixen les característiques principals.

Taula III. Característiques principals dels isoenzims eucariotes CuZn, Mn i EC de la SOD.

<u>CuZn SOD</u>	<u>Mn SOD</u>	<u>EC SOD</u>
Citosol	Matriu mitocondrial	Fluids extracel·lulars
PM= 32.000	PM= 88.000	PM= 135.000
Dues subunitats idèntiques, un àtom de coure i un de zinc cada subunitat	Quatre subunitats idèntiques	Quatre subunitats unides de forma no covalent
Sensible al cianur però resistent al tractament amb cloroform- etanol	Resistent al cianur però sensible al tractament amb cloroform-metanol	
Cromosoma 21 del genoma humà	Cromosoma 6 del genoma humà	
En tots els teixits	En tots els teixits excepte en eritròcits	
Major activitat en fetge i substància blanca del cervell	Major activitat en fetge, cor i pàncrees	

Aquest enzim catalitzador de la transformació del radical superòxid en peròxid d'hidrogen ha estat valorat en l'estudi de diverses patologies i la utilització com a biomarcador d'estrès oxidatiu està molt estesa.

El gen que codifica la CuZn SOD es troba al cromosoma 21. L'alteració d'aquest gen està relacionada, com a mínim, amb dues malalties: la síndrome de Down i l'esclerosi lateral amiotròfica.

La síndrome de Down, caracteritzada per l'existència d'una còpia, o part d'una còpia, addicional del cromosoma 21, comporta la sobreexpressió del gen de la SOD, que es tradueix en un dany en el transport de neurotransmissors i deteriora les unions neuromusculars.

L'esclerosi lateral amiotròfica està associada a un deteriorament del gen de la SOD, per tant, es presenta el deteriorament de l'enzim com a factor crític en el desenvolupament de la patologia, i no només com a cofactor. En els eritròcits, l'activitat de l'enzim disminueix considerablement, la importància d'aquesta disminució pot explicar l'acumulació del radical superòxid a les neurones motores (Higgins i col·ls., *J Neurosci*, 2002).

Per tant, el deteriorament de la defensa antioxidant pot contribuir a la mort neuronal, la qual cosa significa que els radicals lliures són una causa important de les malalties neurodegeneratives i malalties relacionades amb el sistema nerviós. Exemples que s'estudien actualment són l'Alzheimer, la malaltia de Kennedy (desordres de les neurones motores), el Parkinson, el traumatisme cranial, l'esquizofrènia, la isquèmia cerebral aguda i l'envelliment en general (Facchinetti i col·ls., *Cell Mol Neurobiol*, 1998).

La CuZn SOD també ha estat estudiada i valorada com a indicador d'estrès oxidatiu en el càncer, la inflamació intestinal, la malaltia de Crohn (inflamació crònica de la mucosa gastrointestinal), la malaltia de Graves (tirotoxicosi), la cirrosi i la pancreatitis, la malaltia vascular ateroscleròtica, la malaltia coronària arterial i la menopausa, l'artritis reumatoide, el risc de malaltia cardiovascular associada amb altres patologies com la síndrome d'ovaris poliquístics o la diabetis, la malaltia de Blackfoot (trombosi vascular, només present en una zona de Taiwan), la miocarditis aguda viral, la malaltia de Lyme (associada a eritema), l'acne, les afectacions de la còrnia i les malalties mitocondrials entre d'altres (Bednarek i col·ls., *Clin Biochem*, 2005; Hseu i col·ls., *Sci Total Environ*, 2001).

En alguns d'aquests estudis, com en el cas de la malaltia de Graves, es fa referència a la importància de poder utilitzar la determinació de l'estat d'estrès oxidatiu del pacient com a mesura de la gravetat de la malaltia i també d'utilitzar els antioxidants per millorar les manifestacions clíniques de la patologia (Bela i col·ls., *Panminerva Med*, 2001; Guerra i col·ls., *IUBMB Life*, 2001).

La **glutatió peroxidasa (GPx)** és un enzim selenodependent format per quatre subunitats idèntiques que porten cada una, en el lloc actiu, un àtom de seleni sota la forma de selenocisteïna, és a dir, una cisteïna en la qual l'àtom de sofre és reemplaçat per un àtom de seleni.

Existeixen dues formes, una intracel·lular (citosol i mitocondri) i una d'extracel·lular rica en ponts disulfur. Provenen de diferents gens situats al cromosoma 3 (Fulbert i col·ls., *Pathol Biol*, 1992).

Amb la intervenció del glutatió reduït (GSH), catalitza la reducció de l'aigua oxigenada i dels hidroperòxids.

La seva eficàcia va molt lligada a la de la glutatió reductasa, la qual necessita per a la seva acció el NADPH, que li és subministrat gràcies a la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

La GPx destrueix l' H_2O_2 , i de manera general, de tots els hidroperòxids orgànics.

És molt activa en hepatòcits i eritròcit, on la catalasa no intervé si la concentració del peròxid no és gaire elevada. La GPx també participa en la reparació de membranes perquè permet el reciclatge dels fosfolípids per àcids grassos no peroxidats (De Paulet, *Ann Biol Clin*, 1990; Pré, *Pathol Biol*, 1991).

La **catalasa (CAT)** intervé en l'eliminació del peròxid d'hidrogen com a segona línia de defensa. Només és present als peroxisomes i, com hem dit anteriorment, té una afinitat menor que la GPx per als hidroperòxids (Fulbert i col·ls., *Pathol Biol*, 1992; Pré, *Pathol Biol*, 1991).

La diferència radica en el fet que la catalasa usa el H₂O₂ com a substrat i també com a acceptor d'hidrogen, en canvi, la GPx necessita un acceptor addicional.

És un enzim homotetramèric, té un pes molecular de 240.000 daltons, i està constituït per quatre grups prostètics hemínics, en el si dels quals el ferro està sempre sota la forma fèrrica (Pré, *Pathol Biol*, 1991).

La relació de la CAT amb patologia va lligada a una reducció de la reserva antioxidant enzimàtica, és a dir a un nivell d'estrès oxidatiu elevat.

L'acatalasèmia està causada per mutacions en el gen que codifica per aquest enzim, i pot comportar la pèrdua total o parcial de la seva funcionalitat. S'ha estudiat aquest desordre metabòlic en individus de diverses procedències geogràfiques, i s'han trobat diferències entre ells, la qual cosa sembla indicar que hi ha diferents tipus de modificacions en la funcionalitat de la catalasa. També s'ha relacionat l'acatalasèmia amb una elevació del risc de patir alguns trastorns com la diabetis *mellitus* i l'arteriosclerosi (Góth, *Blood Cells Mol Dis*, 2001).

Les **glutatió S-transferasa (GST)** són una família de proteïnes multifuncionals, catalítiques i fixadores, àmpliament distribuïdes, que tenen un paper fisiològic important en la detoxificació, ja que catalitzen la conjugació del grup tiol [-SH] del GSH amb el centre electrofílic d'un gran nombre de molècules hidrofòbiques endògenes i exògenes. Així s'originen els tioèters conjugats, que constitueixen el primer pas en la biosíntesi dels àcids mercaptúrics, que s'eliminaran per l'orina, la qual és un important camí d'eliminació de citotòxics potencials o compostos mutagènics de l'organisme.

El descobriment de multitud d'isoenzims amb diverses especificitats pels substrats i la diversitat de funcions de les GST ha creat un gran interès per estudiar-los. A més, s'ha demostrat l'existència d'expressions alterades en les isoformes de la GST en determinades situacions patològiques. Els isoenzims humans són els α , μ , π i θ . Un resum de les seves característiques es mostra en la taula següent.

Taula IV. Característiques principals dels isoenzims humans de la GST

<u>Classe α</u>	<u>Classe μ</u>	<u>Classe π</u>	<u>Classe θ</u>
Molt heterogènia	Molt heterogènia	Molt heterogènia en múscul i eritròcit	
Dímers	Quatre subunitats		Dues subunitats
PM = 25 kDa	PM= 26 kDa per subunitat		
Cromosoma 6	Cromosoma 1, 3, 6, 13	Cromosoma 11	
Distribuïda per molts teixits sobretot cor, ronyó i fetge	Sobretot a fetge i múscul.	Distribuïda per molts teixits i exclusiva de pit, eritròcits, placenta, plaquetes i tiroïdes	

Cada família d'isoenzims de la GST (α , μ , π i θ) té un *G-site*, és a dir, un lloc de fixació del GSH (Adang i col·ls., *Biochem J*, 1990). L'activitat de la molècula resideix en el reconeixement del grup carboxilat d'una cadena lateral [t-glutamil] del glutatió, i la delectió comporta una pèrdua total de l'activitat. No obstant, determinats residus de l'aminoàcid arginina també poden tenir una gran importància funcional (Stenberg i col·ls., *Biochem J*, 1991).

La GST està lligada a la detoxificació de carcinògens, així com de molts altres tòxics, és per això que molts estudis realitzats en càncer utilitzen aquest enzim com a marcador d'estrès oxidatiu (Giralt i col·ls., *J Invest Dermatol*, 1996; Nogués i col·ls., *J Invest Dermatol*, 2002).

La gran heterogeneïtat de la molècula i la seva importància detoxificadora fa que molts articles publicats relacionin patologia amb variacions o mutacions de l'enzim. En són alguns exemples: artritis reumatoide, anèmia aplàstica, endometriosi, aterosclerosi, leucèmia limfoblàstica i mieloide, esclerosi, pancreatitis, malaltia hipotalamicapituïtària, β -talassèmia, malalties del cor, i també disfuncions renals (Spurdle i col·ls., *Carcinogenesis*, 2001).

La seva variabilitat permet estudiar les poblacions per sexes, raça, segons el grau de tabaquisme, etc., però, a la vegada posa traves a un possible desenvolupament de fàrmacs destinats a reparar, reemplaçar, en resum, activar la seva funció detoxificadora.

3.1.1.3. PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ

Les ERO poden oxidar lípids, proteïnes i DNA, és per això que existeixen biomarcadors diferents segons el lloc diana de l'oxidació .

- Entre els indicadors de les alteracions dels **lípid de membrana** destaquen les substàncies reactives a l'àcid barbitúric (TBARS), entre les quals hi ha el malondialdehid, el 4-OH-nonenal, els diens conjugats i els hidroperòxids (Pré, *Pathol Biol*, 1991).
- Els metabòlits anormals dels **àcids nucleics**, especialment la 8-OH-desoxiguanosina i la 8-OH-guanosina (derivades del DNA i RNA, respectivament) són biomarcadors del dany oxidatiu (Cathcart i col·ls., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984)
- Algunes formes d'ERO ataquen també a les **proteïnes**, i donen origen a derivats carbonil (Stadtman, *Ann N Y Acad Sci*, 2001). Les proteïnes carbonilades són biomarcadors del dany oxidatiu.

3.1.1.3.1 PEROXIDACIÓ DE LÍPIDS

L'oxidació de les lipoproteïnes implica la peroxidació dels seus PUFA i la producció de molts productes, per exemple els **diens conjugats**. Els diens conjugats apareixen en el primer estadi de l'oxidació dels lípids en la qual es produeix una reestructuració dels dobles enllaços dels àcids grassos (Esterbauer i col·ls., *Free Radic Res Commun*, 1989). La susceptibilitat a oxidació dels lípids es pot mesurar, doncs, induint la formació de diens conjugats amb ions de coure.

La mesura dels productes de degradació d'hidroperòxids lipídics com alcans i aldehids, entre els quals es troba el **malondialdehid (MDA)**, és un altre dels procediments per conèixer el grau de peroxidació lipídica en sistemes biològics. Per la seva simplicitat i sensibilitat, un dels tests més utilitzats és l'anomenat TBARS (de l'anglès *thiobarbituric acid reactive substances*).

Els biomarcadors de lipoperoxidació s'utilitzen per mesurar el grau d'estrès oxidatiu sobretot en individus amb malaltia cardiovascular però també s'estudia en els casos de malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer o el Parkinson, en la insuficiència renal, en la malaltia pulmonar obstructiva crònica, etc., i en altres situacions com en l'obesitat o l'envelliment.

3.1.1.3.2 PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES

La introducció de **grups carbonil** en els residus aminoacídics de les proteïnes provocada per radicals lliures és un indicador de la modificació oxidativa. La reacció d'aquests grups amb agents carbonilats proporciona un mètode per detectar i quantificar l'oxidació de proteïnes catalitzada per metalls. Aquesta reacció altera la capacitat funcional de les proteïnes afectades i la seva determinació espectrofotomètrica mitjançant la unió de les proteïnes danyades a dinitrofenilhidrazina forma part de les tècniques d'avaluació del dany oxidatiu.

Les patologies més importants que s'han relacionat amb la peroxidació de lípids i de proteïnes es mostren a la figura 7.

3.1.1.3.3 PEROXIDACIÓ DEL DNA







La determinació de **derivats hidroxilats de guanosina i de desoxiguanosina** ha estat descrit per valorar de manera indirecta el grau d'afectació dels àcids nucleics quan han estat en contacte amb les ERO. Existeixen diversos treballs que demostren un augment dels valors de 8-OH-desoxiguanosina, procedent del DNA mitocondrial, en subjectes sotmesos a esforços intensos i en pacients afectats amb malalties musculars degeneratives (Okamura i col·ls., *Free Radic Res*, 1997). Aquests indicadors poden valorar-se mitjançant tècniques d'HPLC, però recentment s'han comercialitzat anticossos capaços de reaccionar amb tots dos derivats de la guanosina, que poden aplicar-se a tècniques d'ELISA i d'immunohistoquímica. No obstant, els resultats d'aquests mètodes han estat posats en dubte per alguns autors

que afirmen que els valors obtinguts són, en la seva majoria, fruit dels artefactes de la tècnica.

La fragmentació del DNA també es pot valorar directament mitjançant tècniques com ara la tècnica cometa (de l'anglès *comet assay*) o el TUNEL (de l'anglès *terminal uridine nick end-labeling assay*). El problema és que aquests mètodes avaluen el dany al DNA en general i no només aquell que ha estat ocasionat pels RLLO (Dotan i col·ls., *Prog Lipid Res*, 2004).

Per avaluar l'estat del balanç prooxidant-antioxidant d'un individu s'han de tenir en compte biomarcadors que ens informin d'aquesta situació a tots els nivells: valorant quantes ERO s'estan formant, quins mecanismes estan a punt per eliminar-les i quines són les conseqüències de l'oxidació que no s'ha pogut evitar.

Figura 7. Malalties i situacions fisiopatològiques en les que s'ha determinat l'existència d'estrès oxidatiu amb biomarcadors de peroxidació.

	LIPOPEROXIDACIÓ	PEROXIDACIÓ DE PROTEÏNES
 MALALTIES CARDIOVASCULARS	Arteriosclerosi, Isquèmia-Reperfusió, Malaltia de l'artèria coronària, Fallida cardíaca, Malaltia renovascular, Hipercolesterolèmia, Diabetis, Hiperhomocisteïnèmia, gènere masculí i fumar	Isquèmia-Reperfusió, Diabetis
 MALALTIES NEUROLÒGIQUES	Alzheimer, Huntington, Esclerosi múltiple, Malaltia de Creutzfeld-Jacob	Alzheimer, Esclerosi lateral amiotròfica, Demència amb cossos de Lewy, Parkinson
 MALALTIES PULMONARS	Asma, MPOC, Fibrosi quística, Malaltia intersticial pulmonar, Dany pulmonar agut o Síndrome del distrès respiratori agut	Síndrome del distrès respiratori agut, MPOC, Displàsia broncopulmonar, Fibrosi quística
 MALALTIES RENALS	Hemodiàlisi, Dany renal induït per rabdomiòlisi	Insuficiència renal crònica, urèmia crònica
 MALALTIES HEPÀTIQUES	Dany hepàtic per alcoholisme crònic, Síndrome hepatorenal, Cirrosi urinària biliar, Trasplantament de fetge	
 ALTRES MALALTIES	Esclerodèrma, Síndrome de Down, Malaltia de Crohn, Osteoporosi	Caracterogènesi, Preeclàmpsia, Psoriasis, Artritis reumatoide i Artritis crònica juvenil, Sèpsia severa, Amiloïdosi sistèmica, Varicel·la

Adaptat de Dalle-Done i col·ls. (*Trends Mol Med*, 2003) i Montuschi i col·ls. (*FASEB*, 2004)

3.1.2. SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ

Les ERO són responsables de l'alteració de la membrana cel·lular quan és exposada a un estrès oxidatiu. Aquest dany excessiu a les membranes cel·lulars pot contribuir a potenciar l'aparició i progrés de determinades malalties degeneratives com ara el càncer o malalties cardiovasculars. L'efecte de les ERO sobre els eritròcits humans s'ha utilitzat com a biomarcador de la susceptibilitat d'oxidació, a causa de la relativa facilitat per obtenir aquesta mostra. Els eritròcits són vulnerables a la peroxidació lipídica ja que contenen molts PUFA, metalls de transició i transporten oxigen. L'eritròcit té molts sistemes per a protegir-se del dany de les ERO i de l'hemòlisi: els enzims SOD, CAT i GPx, l'àcid ascòrbic i l'àcid úric, l' α -tocoferol, etc. Si no són eliminades, l'agressió de les ERO dóna com a resultat l'escapada de potassi al medi extracel·lular i una consegüent **hemòlisi** (Bureau i col·ls., *Biomed Pharmacother*, 2005). Quan s'utilitza l'hemòlisi com a biomarcador de l'estat oxidatiu de l'individu, els eritròcits es posen en contacte amb un oxidant, com ara el 2,2'-azobis(2-amidinopropà)hidroclorid (AAPH), o amb una espècie reactiva d'oxigen, com el peròxid d'hidrogen, i es valora l'hemòlisi produïda com a conseqüència d'aquesta oxidació induïda.

Les deficiències en els sistemes antioxidants, l'atac intensiu de les ERO, algunes malalties com la β -talassèmia, l'anèmia hemolítica, la deficiència en G6PDH i altres motius poden incrementar la susceptibilitat de l'eritròcit a la peroxidació (Zhu i col·ls., *Exp Biol Med*, 2002).

3.1.3. CAPACITAT ANTIOXIDANT

La capacitat antioxidant total d'una mostra per eliminar radicals lliures s'utilitza cada cop més per valorar, de manera més general, l'estat oxidatiu de l'individu (Widlansky i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2005). Molts d'aquests mètodes han estat dissenyats inicialment per valorar la capacitat antioxidant de productes alimentaris. No obstant això, existeixen estudis que valoren la capacitat antioxidant tant de mostres biològiques, per exemple del plasma, com de mostres d'aliments, especialment fruites, verdures i fruita seca (Prior i col·ls., *J Agric Food Chem*, 2003). La majoria de treballs, en animals o humans, valoren la capacitat antioxidant de mostres biològiques després d'haver administrat un aliment antioxidant (Cao i col·ls., *Am J Clin Nutr*, 1998; Proteggente i col·ls., *Free Radic Res*, 2002). Per exemple, Sweeney i col·ls. valoren la capacitat antioxidant i de recuperació de rates alimentades amb nabius després d'induir-los un dany en el cervell (*Nutr Neurosci*, 2002). Els assajos més importants per determinar la capacitat antioxidant es mostren a la figura 6 i es detallen a la taula següent (taula V):

Taula V. Característiques principals dels biomarcadors de capacitat antioxidant

<u>ORAC</u>	<u>TRAP</u>	<u>TEAC</u>	<u>FRAP</u>
<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>	<i>Total radical trapping antioxidant parameter</i>	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>	<i>Ferric iron reducing antioxidant parameter</i>
Reacció amb transferència d'àtoms d'H	Reacció amb transferència d'àtoms d'H	Reacció amb transferència d'electrons	Reacció amb transferència d'electrons
Formació de radicals peroxil amb AAPH	Formació de radicals peroxil amb AAPH	Oxidació dels antioxidants amb ABTS	Oxidació dels antioxidants amb Fe (III)
Cao i Prior <i>Methods Enzymol</i> 1999	Miller <i>Clin Sci</i> 1993	Rice i Evans <i>Methods Enzymol</i> 1994	Benzie i Strain <i>Anal Biochem</i> 1996

3.2. L'ESTRÈS OXIDATIU EN DIFERENTS SITUACIONS

Les conseqüències negatives de l'efecte de les ERO en l'organisme humà ha fet que aquests sistemes i tots els mecanismes que hi estan relacionats siguin àmpliament estudiats, no tan sols en el context de la malaltia sinó també en situacions fisiològiques diferents, com per exemple l'envelliment o l'embaràs, que no tenen perquè relacionar-se amb cap patologia. Utilitzar els coneixements que es van acumulant per millorar la clínica dels individus afectats és l'objectiu final de tots ells, no obstant, els sistemes implicats en l'estrès oxidatiu són diferents en cada una de les situacions que s'estudien i cal establir criteris d'actuació diferenciats en cada cas.

3.2.1. ESTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS PATOLÒGIQUES

Les espècies reactives de l'oxigen i els radicals lliures d'oxigen són causa i conseqüència de moltes patologies. Tal com ja s'ha comentat, el càncer, l'arteriosclerosi, les malalties neurodegeneratives i totes les malalties que es comentaran a continuació han estat relacionades sens cap mena de dubte amb el dany radicalari. En aquest apartat ens limitarem a comentar aquelles patologies que són objecte d'estudi en el nostre treball.

3.2.1.1. INSUFICIÈNCIA RENAL

En humans i altres mamífers el metabolisme renal requereix aproximadament el 10 % del consum basal d'oxigen, així, el ronyó sa produeix espècies reactives de l'oxigen i

radicals lliures que poden ser eliminats per mecanismes de defensa antioxidants (Suliman i col·ls., *Blood*, 2004).

En condicions d'insuficiència renal (IR), el ronyó redueix progressivament les seves funcions, com ara la capacitat de filtració glomerular. A més, en els individus que pateixen IR la eritropoesi no funciona correctament, el ronyó no produeix prou eritropoetina (EPO), la medul·la òssia redueix la producció d'eritròcits i es produeix anèmia, més o menys severa depenent de l'estat de la insuficiència renal.

En anteriors treballs s'ha suggerit que les ERO tenen un paper important en el desenvolupament de la disfunció renal (Baker i col·ls., *Ann Surg*, 1985). En estudiar els mecanismes fisiopatològics bàsics dels trastorns renals, com la isquèmia o el dany glomerular, es veu que en tots hi són presents factors que predisposen al desequilibri oxidatiu. Les ERO danyen les cèl·lules del ronyó mitjançant la peroxidació de lípids de membrana, la inactivació de receptors de membrana i enzims, la despolimerització de polisacàrids o el dany a altres proteïnes. A més, les ERO actuen normalment com a reguladores de l'expressió de l'EPO, així, nivells alts de peròxid d'hidrogen o d'anió superòxid inhibeixen la producció d'EPO (Goldberg, *Science*, 1988). Quan ens trobem en una situació d'IR, amb nivells alts d'ERO, hi ha una excessiva inhibició de l'EPO i una consegüent anèmia (Fandrey i col·ls., *Biochem J*, 1994). Per això, en molts casos s'administra EPO als individus amb IR.

En conclusió, les ERO es relacionen tant amb el dany cel·lular present en la IR com amb l'anèmia que va lligada a aquesta malaltia.

Tanmateix, la majoria d'estudis existents, fins ara, que relacionen la IR amb la producció d'ERO s'han realitzat en pacients sotmesos a hemodiàlisi, i és la membrana dialitzadora la principal responsable de l'augment dels RLLO en aquests pacients.

S'ha demostrat que aquestes membranes indueixen la producció de radicals lliures a causa de l'activació dels monòcits i neutròfils de la sang quan es posen en contacte amb una superfície no biològica.

Aquesta reacció té com a conseqüència un augment de la lipoperoxidació i una afectació del metabolisme del glutatió en els eritròcits i de l'expressió dels enzims antioxidants com la superòxid dismutasa (Buoncristiani i col·ls., *Nephron*, 1997; Galli i col·ls., *Clin Chem*, 1999; Trznadel i col·ls., *Free Radic Biol and Med*, 1990).

En aquest treball volem valorar quin és l'estat oxidatiu de pacients amb IR que no han estat tractats amb hemodiàlisi i determinar l'efecte de l'administració d'EPO en aquests individus. D'aquesta manera podrem saber quin és l'estat oxidatiu com a conseqüència de la malaltia, sense tenir en compte l'estrès oxidatiu que provoquen les membranes hemodialitzadores.

3.2.1.2. MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

L'ésser humà està exposat diàriament a la inhalació d'una combinació de partícules, moltes d'e les quals generadores exògenes d'ERO. La quantitat de partícules inhalades depèn bàsicament de l'estil de vida de l'individu, de la seva situació laboral i del lloc de residència. En individus fumadors, l'exposició a aquests agents tòxics es multiplica, de manera que també es multiplica la seva mortalitat i morbiditat per complicacions cardiopulmonars, especialment en aquells que ja estaven malalts (Tao i col·ls., *Free Radic Biol and Med*, 2003). Moltes d'aquestes partícules són o generen directament ERO però algunes també activen la resposta inflamatòria i, al mateix temps, les cèl·lules inflamatòries produeixen ERO o mediadors, com el factor de

necrosis tumoral α que opera a través de mecanismes relacionats amb les ERO (Churg i col·ls., *Free Radic Biol and Med*, 2003). Per tant, l'exposició a agents oxidants per inhalació és constant i inevitable en humans, encara que variable segons els factors que ja s'han comentat.

Els sistemes antioxidants permeten eliminar aquests agents agressors impedit la generació de les ERO o eliminant-les. No obstant, quan la resposta no és prou eficient o s'inhibeixen o es desregulen els enzims antioxidants, apareix un estrès oxidatiu que empitjora l'estat d'algunes malalties com la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) (Lawler i col·ls., *Biochem Biophys Res Commun*, 2002).

La MPOC es caracteritza per la presència d'un procés inflamatori crònic que afecta les vies aèries, el parènquima i la circulació pulmonar. El fum del tabac n'és la causa principal ja que produeix estrès oxidatiu, altera el balanç dels enzims proteases-antiproteases i activa la resposta inflamatòria. La malaltia no es desenvolupa en tots els fumadors, depèn del nivell d'exposició als agents tòxics, de la susceptibilitat individual i genètica i de la capacitat d'eliminació d'aquestes partícules.

3.2.1.3. SÈPSIA

La **sèpsia** és un estat molt complex que pot derivar cap a un xoc sèptic o una fallida multiorgànica, per aquest motiu està associat amb un alt nivell de mortalitat als centres hospitalaris i sobretot a les unitats de cures intensives. Els símptomes són inflamació aguda, incloent-hi febre o hipotèrmia, taquipnea, taquicàrdia, augment en la sang de les cèl·lules blanques, edema pulmonar i finalment fallida multiorgànica (Victor, *Int*

Immunopharmacol, 2004). La resposta inflammatòria és inespecífica i va acompanyada d'una intensa activació dels neutròfils, de manera que es produeix un dany tissular de tipus oxidatiu en un òrgan o més. El fracàs del sistema cardiovascular, renal, hepàtic, nerviós central, pulmonar i del múscul esquelètic sembla que es produeix com a conseqüència de l'augment de producció de radicals lliures i de la lesió del parènquima associada a l'activitat oxidativa i a l'estrès oxidatiu.

Les fonts d'ERO més influents en els individus amb sèpsia són:

- la cadena de respiració mitocondrial,
- la cascada metabòlica de l'àcid araquidònic,
- l'activació de l'enzim xantinaoxidasa, resultat de la isquèmia i reperfusió,
- els granulòcits i altres fagòcits activats per bacteris,
- endotoxines, enzims lisosomals, etc.,
- i altres oxidases com la NADPH oxidasa.

En la sèpsia és important quantificar el nivell de gravetat de la malaltia per poder establir la pauta de tractament, que pot ser diferent en cada individu. El risc d'aquest estat d'inflamació extrema es calcula amb un mètode d'avaluació anomenat APACHE (de l'anglès *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*) basat en el nivell d'alteració d'unes quantes variables fisiològiques. No obstant, potser seria més lògic avaluar la gravetat de la malaltia mesurant el nivell d'estrès oxidatiu de l'individu ja que els dos paràmetres, mortalitat i estrès oxidatiu, van lligats de manera indiscutible.

3.2.1.4. INFART AGUT DE MIOCARDI

L'**infart agut de miocardi** (IAM) es caracteritza per un sofriment isquèmic a una part del múscul cardíac a conseqüència de l'obstrucció aguda d'una de les artèries coronàries que l'alimenten. La cardiopatia isquèmica en general, i l'IAM en particular, així com el fenomen isquèmia-reperfusió, constitueixen processos en la fisiopatologia dels quals hi són presents els radicals lliures. No solament és una malaltia freqüent, sinó altament letal, amb un nivell de mortalitat que s'ha estimat entre el 20 i 50 % durant la fase aguda (Lefer, *Am J Med*, 2000).

Els radicals lliures i les espècies reactives de l'oxigen juguen un paper important en moltes malalties. En aquest sentit, es desconeix si són causa o conseqüència de la situació patològica i també caldria aclarir, en molts dels casos, quin nivell del sistema prooxidant-antioxidant està afectat.

3.2.2. ESTRÈS OXIDATIU EN SITUACIONS FISIOLÒGIQUES

Les cèl·lules aeròbies generen RLLO constantment i el dany que produeixen és detectable no només en situacions de patologia sinó també en individus sans i joves. Així, quan l'eficiència dels sistemes antioxidants per eliminar els radicals no és del 100 %, els individus pateixen, en certa mesura, estrès oxidatiu.

3.2.2.1. ENVELLIMENT

L'estudi de les causes que porten a l'ésser humà, i tots els altres individus pluricel·lulars, a envellir ha generat força teories:

- Una de les hipòtesis més ben acceptades és la que assenyala els radicals lliures i al consegüent estrès oxidatiu com a responsable de l'envelliment (Harman, *J Gerontol*, 1994).
- Les teories genètiques proposen com a causa de l'envelliment el cúmul de mutacions en el DNA (Szilard, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1959) i modificacions en l'expressió gènica que porten a una diferenciació terminal de la cèl·lula o a una desregulació general (Slagboom i col·ls., *Genome*, 1989).
- La teoria d'error i catàstrofe diu que els errors acumulats en les proteïnes són els responsables d'aquest procés fisiològic (Orgel, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970).

- Una altra teoria postula que les unions moleculars entre proteïnes augmenten amb l'edat i n'alteren la funcionalitat (Kristal i col·ls., *J Gerontol*, 1992).
- Alguns autors afirmen que el cúmul de productes "escombraria" provoca l'aturada de la divisió cel·lular (Sheldrake, *Nature*, 1974).
- Una altra teoria és aquella que destaca la disminució de l'eficàcia del sistema immunitari com a generador del procés senil (Makinodan i col·ls., *Adv Immunol*, 1980).
- I finalment hi ha una sèrie de teories que afirmen que els processos que es van succeint durant l'envelliment estan programats de manera innata dins el genoma de cada organisme (Harley i col·ls., *Exp Gerontol*, 1992).

Moltes d'aquestes hipòtesis són compatibles entre si, ja que poden ser causes acumulables de l'envelliment, no obstant això, les teories de l'estrès oxidatiu i la de la programació genètica de l'envelliment són dues hipòtesis totalment incompatibles (Sohal i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2002).

L'envelliment es produeix en totes les escales: molecular, cel·lular i en l'òrgan. De la mateixa manera, el dany a proteïnes, lípids i DNA que provoquen els radicals lliures creix exponencialment amb l'edat i pot afectar de manera negativa tots tres nivells. L'estrès oxidatiu al mitocondri, concretament els nivells de $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 , són els marcadors d'envelliment més utilitzats ja que es correlacionen positivament amb la despesa metabòlica que, alhora, es correlaciona negativament amb el temps de vida màxim en mamífers (Sohal i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2002).

S'ha demostrat que algunes proteïnes pateixen dany oxidatiu de manera selectiva durant l'envelliment (Stadtman i col·ls., *Ann NY Acad Sci*, 2000) i les conseqüències del seu malfuncionament són característiques fisiològiques del pas del temps. Així, el nivell de carbonilació proteica és millor biomarcador d'envelliment que el dany als lípids o al DNA.

3.2.2.2. GÈNERE

El gènere o sexe està relacionat amb la susceptibilitat de patir determinades malalties en les que la producció d'ERO hi juga un paper important, per exemple el càncer, més freqüent en el gènere masculí (Sverko i col·ls., *Biogerontol*, 2004). A més, s'ha vist que el gènere també influeix en el funcionament del metabolisme normal, no lligat a malaltia, en el que poden intervenir les ERO. En hámster, per exemple, la concentració de la GPx en la glàndula de Harder, un òrgan molt relacionat amb la melatonina, varia en mascles i femelles (Coto-Montes i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2001). El gènere i l'envelliment s'estudien de manera conjunta en alguns treballs que valoren el grau d'estrès oxidatiu mitjançant diferents biomarcadors: biomarcadors de lipoperoxidació (Sverko i col·ls., *Gerontol*, 2002); biomarcadors del dany al DNA (Mendoza-Núñez, *Mech Ageing Dev*, 2001); i biomarcadors de la capacitat antioxidant, entre d'altres (Mendoza-Núñez, *Mech Ageing Dev*, 2001).

La dona té una esperança de vida més alta que l'home, les dones viuen uns 5 anys més que els homes. Resulta lògic doncs que en molts dels estudis relacionats amb l'estrès oxidatiu troben més protegides a les dones que als homes. Per aquest motiu s'estudien les variables que poden ser responsables d'aquestes diferències entre homes i dones. En aquest sentit, alguns autors donen als estrògens el paper de protectors de l'atac de les ERO (Fano, *J Muscle Res Cell Motil*, 2001). La major longevitat femenina també ha estat explicada per la prevalença de càncer colorectal i atacs coronaris en homes, que s'han relacionat, al mateix temps, amb el dany oxidatiu al DNA.

3.2.2.3. EMBARÀS

L'embaràs no es considera una malaltia, tot i així, va associat a grans canvis en el perfil metabòlic i psicològic que es van succeint de manera progressiva i periòdica durant 40-42 setmanes. Alguns d'aquests canvis són agressius per a la mare però indispensables per a mantenir i fer créixer el fetus. Una de les variacions més importants és la creixent demanda d'oxigen per part de la mare ja que el fetus requereix un ambient aeròbic per desenvolupar-se correctament, però aquest oxigen facilita també la formació de radicals lliures i ERO. Per tant, les dones embarassades poden tenir un nivell d'estrès oxidatiu més elevat (Upadhyaya, *Indian J Clin Biochem*, 2005). Durant l'embaràs també augmenta la demanda de ferro per poder incrementar la quantitat d'eritròcits que el fetus necessitarà per créixer normalment, això fa que en moltes dones sorgeixi un cert grau d'anèmia i dèficit de ferro que se soluciona amb un suplement d'aquest metall. Segons alguns autors, l'administració rutinària de ferro a dones embarassades fa que aquelles que no tenien dèficit de ferro utilitzin aquest

metall per formar el radical hidroxil a partir de l'oxigen (reacció de Fenton) i tinguin, per tant, més estrès oxidatiu (Scholl, *Am J Clin Nutr*, 2005).

3.2.2.4. ESTRÈS PSICOLÒGIC

La relació entre l'estrès psicològic i l'estrès oxidatiu ha estat estudiat en diversos treballs. Lesgards i col·ls. varen estudiar l'efecte de l'estil de vida sobre l'estrès oxidatiu en un grup d'individus sans. En el seu qüestionari es van incloure factors endògens (gènere, edat, exercici físic i estrès psicològic, en concret, es van classificar els individus segons el nivell d'estrès laboral i estrès a la llar) i factors exògens (dieta, tabaquisme, irradiació solar i presa d'alcohol). Van valorar l'estrès oxidatiu utilitzant el test d'hemòlisi com a biomarcador únic de la potència antiradicalar total i van concloure que l'estrès psicològic era el factor d'estil de vida que es correlacionava més fortament amb una disminució de la capacitat antioxidant (Lesgards i col·ls., *Environ Health Perspect*, 2002). En un altre estudi, Chalmers i col·ls. evidencien la relació de l'estrès psicològic i l'estrès oxidatiu en individus amb depressió i amb estudiants en període de vacances i després dels exàmens universitaris o durant la redacció de la tesi doctoral. En aquest cas el biomarcador utilitzat va ser l'enzim 5'-ectonucleotidasa, que es troba a la superfície externa dels limfòcits. Segons aquests autors, l'estrès psicològic és la causa de l'estat prooxidant elevat ja que els individus amb estrès psicològic tenen el nivell de cortisol elevat, això fa que la resposta immunitària estigui activada de manera crònica i es produeixi, en conseqüència, un estat prooxidant (Chalmers i col·ls., *Environ Health Perspect*, 2003). Posteriorment, Sivonová i col·ls. també van avaluar l'estrès oxidatiu en estudiants universitaris abans i després dels exàmens, en aquest cas es van determinar la fragmentació del DNA,

amb la tècnica de cometa (de l'anglès *comet assay*), l'oxidació dels lípids, amb la tècnica dels diens conjugats, i l'estat antioxidant general, amb la determinació del FRAP. Els resultats mostraven un major dany oxidatiu al DNA i als lípids i una menor capacitat antioxidant en els estudiants que havien sofert estrès psicològic (Sivonova i col·ls., *Stress*, 2004).

En molts casos, l'estrès psicològic va acompanyat d'hàbits no saludables que són prooxidants, per tant, en el nostre treball també volem valorar quin pes té l'estil de vida en l'estrès oxidatiu que existeix en els individus psicològicament estressats.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

L'envelliment, els processos inflamatoris, la patologia renal i moltes altres situacions fisiològiques i patològiques s'han relacionat amb la producció d'espècies reactives de l'oxigen. En realitat, aquesta relació ens marca un desequilibri entre la producció de RLLO i els mecanismes de defensa. Són molts els factors que intervenen en aquest desequilibri, per tant, són molts els biomarcadors que ens poden donar informació sobre aquest procés. Però, com ja hem comentat, cal recordar en primer lloc, que és molt difícil determinar directament les ERO per la semivida curta, i els mètodes existents no poden aplicar-se a situacions clíniques quotidianes; en segon lloc, quan es generen ERO en major quantitat del normal i/o quan disminueixen les defenses anti-ERO es produeixen una sèrie d'alteracions moleculars que comporten un increment dels indicadors de dany molecular; i en tercer lloc, donat que existeix una interrelació entre alguns dels sistemes de defensa enzimàtics i no enzimàtics i que aquests són capaços d'adaptar-se segons la quantitat d'ERO generades, és evident que un augment en la producció d'ERO determinarà canvis en aquests sistemes. Per tant, valorant les concentracions d'alguns d'aquests factors defensius i les activitats dels enzims implicats en la defensa anti-ERO, podem també valorar indirectament les situacions de distrès oxidatiu, però cap d'ells, de manera individual, ens definirà en termes universals l'estrès oxidatiu.

Per tant, es fa necessari tenir un model de valoració global del distrès oxidatiu que pugui ser utilitzat com a indicador dels processos relacionats amb el desequilibri del balanç antioxidant-prooxidant. En aquest sentit, en el treball de suficiència investigadora (Romeu i col·ls., 2002), vàrem definir un model que quantifica el grau de distrès oxidatiu mitjançant una escala numèrica.

Davant d'aquests antecedents, la nostra hipòtesi de treball suposa que:

Un model de puntuació global basat en biomarcadors indirectes és capaç de valorar el desequilibri entre els sistemes prooxidants i antioxidants tant en situacions de malaltia com fisiològiques, i ha de permetre detectar a què és degut el desequilibri en cada una de les situacions fisiopatològiques estudiades: a una major producció de RLLO, a una disminució en la disponibilitat dels antioxidants, o a ambdues.

OBJECTIUS

Primer objectiu: Definir, en la població sana, els rangs de normalitat pels biomarcadors sistèmics següents: TBARS, GSH, GSSG, ràtio GSSG/GSH, GST, SOD, CAT, GR, GPx i hemòlisi.

Segon objectiu: Establir el pes dels biomarcadors estudiats en el model de puntuació global que ens ha de permetre valorar el grau de distrès oxidatiu en diferents situacions fisiològiques i patològiques.

Tercer objectiu: Aplicar el model de puntuació en diferents situacions fisiològiques i patològiques en desequilibri oxidatiu.

Quart objectiu: Comparar el model de puntuació proposat amb un model estadístic de puntuació de discriminants

MATERIAL I MÈTODES

1. DESCRIPCIÓ DE LA POBLACIÓ D'ESTUDI

Les poblacions d'estudi que inclouen diferents situacions fisiològiques i patològiques han estat les següents:

- Persones control
- Pacients amb insuficiència renal crònica no sotmesos a hemodiàlisi
- Pacients amb insuficiència renal crònica tractats amb eritropoetina
- Pacients amb malaltia pulmonar obstructiva crònica
- Pacients amb sèpsia
- Pacients amb infart
- Dones embarassades
- Estudiants universitaris

En tots aquests grups es va obtenir una breu història que s'ha utilitzat per conèixer els hàbits i antecedents que poden ser importants en l'estudi. La història conté la identitat de l'individu, nom i cognoms, el sexe, l'edat, l'any d'inici de la menopausa en el cas de les dones que la tinguin, el grau de tabaquisme, les patologies i la medicació actual de l'individu. En alguns dels grups es van obtenir, també, les dades clíniques més rellevants i lligades a la patologia.

També ha estat necessària l'extracció de la sang (10 ml en total) de cada individu que s'ha realitzat mitjançant punció venosa i la mostra s'ha repartit en dos tubs amb anticoagulants diferents (un amb Heparina-Liti i l'altre amb EDTA). Tots els estudis han estat aprovats pels Comitès Ètics de la institució corresponent i cada participant ha signat el consentiment informat.

1.1. CONTROLS SANS

Per dur a terme l'estudi del distrès oxidatiu s'ha utilitzat sang humana d'un total de 164 persones sanes (52 homes i 112 dones). Les mostres s'han obtingut del Servei d'Endocrinologia de l'Institut Universitari Dexeus i de voluntaris sans que van acudir a la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut (URV).

La mitjana d'edat va ser de 48,41 anys \pm 14,54 amb un rang que comprenia dels 21 als 81 anys. Els 164 participants en l'estudi no tenien cap patologia ni rebien cap medicació rellevant, per exemple antioxidants, en el moment de l'anàlisi de sang. L'administració d'antioxidants podria alterar els paràmetres relacionats amb el distrès oxidatiu que s'estudien en el nostre treball, ja que comporten una aportació extra de protecció davant els radicals lliures.

Els controls sans de referència en cada una de les situacions fisiopatològiques estudiades provenen d'aquesta mostra inicial, es van dividir segons criteris de nombre d'individus, edat i sexe, i s'anomenen grup "CONTROL".

1.2. INSUFICIÈNCIA RENAL

La valoració de l'estrès oxidatiu en la insuficiència renal s'ha realitzat amb mostres de sang humana de 63 malalts renals prediàlisi, que s'anomenarà "IR", els quals no van rebre tractament amb eritropoetina. Aquest grup estava format per 33 homes i 30 dones. La mitjana d'edat era de 62,16 anys \pm 14,31 amb un rang que comprenia des dels 17 als 78 anys.

No tots els individus presentaven la mateixa etiologia de la IR tal com veiem en el següent quadre:

ETIOLOGIA	NOMBRE D'INDIVIDUS
nefropatia diabètica	11
vascular	12
glomerular	12
tubulointersticial	18
causa indeterminada	10

A més, també vam disposar de paràmetres clínics relacionats amb la malaltia renal com la creatinina. L'aclariment de creatinina té en compte el nivell de creatinina, l'edat, el sexe i, evidentment, el pes de l'individu segons la fórmula següent:

$$((140 - \text{EDAT}[\text{anys}]) \times \text{PES} [\text{Kg}]) / (\text{CREATININA} [\mu\text{mol/L}] \times 0,81)$$

multiplicat per 0,85 en les dones

Del total d'individus amb IR, 39 van iniciar un tractament amb eritropoetina (EPO), que es va mantenir durant sis mesos, amb una dosi de 40-60 unitats/kg per via subcutània dues vegades a la setmana. L'administració d'aquesta hormona té la finalitat de corregir l'anèmia lligada a la patologia renal. En tot aquest temps, aquests malalts, que anomenarem EPO 0 (abans del tractament amb eritropoetina) i EPO1 (després de sis mesos de tractament amb EPO), no estaven sotmesos a hemodiàlisi. Les dades clíniques més rellevants que van ser controlades van ser l'hemoglobina i el ferro. Aquest grup estava format per 18 homes i 21 dones. La mitjana d'edat era de 63,67anys \pm 12,52 amb un rang que comprenia dels 27 als 78 anys.

En tots els casos, la sang dels individus es va obtenir del Servei de Nefrologia de l'Hospital Joan XXIII.

1.3. MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC)

La relació entre MPOC i estrès oxidatiu s'ha estudiat en mostres de sang humana de 14 malalts, que s'anomenarà "MPOC". Aquest grup estava format per 12 homes i 2 dones. La mitjana d'edat era de 55,33 anys \pm 9,54 amb un rang que comprenia dels 42 als 64 anys.

La sang dels individus es va obtenir del Servei de Pneumologia de l'Hospital Sant Joan de Reus i de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona.

1.4. SÈPSIA I INFART AGUT DE MIOCARDI

L'estrès oxidatiu dels individus amb sèpsia s'ha estudiat en mostres de sang humana de 8 malalts, que s'anomenarà "SÈPSIA". Aquest grup estava format per 7 homes i 1 dona. La mitjana d'edat era de 62 anys \pm 16,37 amb un rang que comprenia dels 25 als 78 anys.

Com en tots els altres casos, aquests individus s'han comparat amb un grup de controls sans de les mateixes característiques de nombre d'individus, sexe i edat. No obstant això, aquest grup de malalts sèptics també s'ha comparat amb un grup d'individus que eren a la unitat de cures intensives després d'haver patit un infart agut de miocardi, els anomenarem "IAM". Aquests pacients presentaven un quadre greu, igual que els pacients amb sèpsia, però sense la infecció generalitzada que caracteritza els malalts sèptics.

El grup "IAM" estava format per 9 individus, 7 homes i 2 dones. La mitjana d'edat era de 67,44 anys \pm 8,23 amb un rang que comprenia dels 54 als 81 anys.

En tots els casos, la sang dels individus ha estat obtinguda de la Unitat de Cures Intensives de l'Hospital Joan XXIII. L'anàlisi del distrès oxidatiu s'ha realitzat en quatre ocasions: al moment de l'ingrés a la UCI, 24 i 48 hores després de l'ingrés i en el moment de l'alta, la quarta mostra no s'ha pogut obtenir de tots els pacients, en alguns casos perquè l'alta es produïa entre les 24 i 48 hores o, i en altres casos per la mort del pacient.

1.5. ENVELLIMENT

L'envelliment ha estat estudiat en un grup de 115 individus extrets de la mostra inicial de 164 controls sans i de les Aules de la Gent Gran de la URV. Només es van incloure aquells individus que tenien la bateria de biomarcadors completa, per tant, els 49 individus exclosos no tenien el resultat d'algun dels biomarcadors. En el grup hi havia 38 homes i 77 dones, la mitjana d'edat era de 50,77 anys \pm 15,49 amb un rang que comprèn dels 21 als 81 anys. Es van establir tres subgrups segons l'edat per veure'n els efectes sobre l'estrès oxidatiu: individus de 21 a 50 anys (22 homes i 31 dones), de 51 a 65 anys (11 homes i 30 dones) i més de 65 anys (5 homes i 16 dones).

1.6. GÈNERE

L'efecte del gènere sobre l'estrès oxidatiu s'ha valorat amb el mateix grup de 115 individus controls sans que en el cas de l'envelliment. En aquesta ocasió s'han comparat els subgrups "HOMES" i "DONES".

1.7. EMBARÀS

L'estat de la balança prooxidant-antioxidant durant l'embaràs s'ha estudiat en un grup de 73 dones. Atès que l'embaràs s'associa a un grau més o menys important d'anèmia, totes les participants rebien un tractament preventiu amb ferro.

Cap d'elles presentava anèmia a la setmana 10 de gestació, però a la setmana 26, el 62 % tenien una hemoglobina per sota d'11mg/dl (criteri diagnòstic d'anèmia en la

població d'embarassades). La dosi mitjana de ferro va ser de 70 mg al dia des de la setmana 15 i durant tot l'embaràs. Els biomarcadors d'estrès oxidatiu es van valorar durant la setmana 26 de gestació.

Els controls sans, que es van usar per comparar amb les embarassades, són dones del mateix rang d'edat que pertanyien al grup de control sà descrit anteriorment.

1.8. ESTRÈS PSICOLÒGIC

L'estrès oxidatiu que genera un estrès psicològic ha estat estudiat en 42 individus sotmesos a exàmens universitaris, 16 homes i 26 dones. La mitjana d'edat era de 21,78 anys \pm 2,37 amb un rang que comprenia des dels 19 als 30 anys.

Els biomarcadors es van valorar dues vegades. Una primera analítica al desembre (no tenien exàmens) i una segona valoració al febrer (acabaven de fer els exàmens). A part de la breu història inclosa en tots els individus esmentats fins ara, els estudiants eren sotmesos a un qüestionari sobre el canvi d'hàbits que havien sofert entre la primera i la segona anàlisi, com a conseqüència de l'adaptació al període d'exàmens.

Els cursos i estudis que els estudiants estaven realitzant en el moment de l'anàlisi es detallen en el quadre explicatiu següent:

CURS	ENSENYAMENT		
	Medicina	Fisioteràpia	Nutrició
primer	3	2	4
segon	7	4	4
tercer	4	2	2
quart	4		
cinquè	4		
sisè	2		

2. OBTENCIÓ, PREPARACIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

2.1. TUB D'HEPARINA-LITI

El plasma i els eritròcits es van separar centrifugant durant 15 minuts a 850 xg i a 4°C. El plasma sobrenedant es va extreure tenint en compte de no aspirar la fina capa de leucòcits que la separa dels eritròcits. Els leucòcits es van descartar. Els eritròcits es van rentar dues vegades amb sèrum fisiològic centrifugant 5 minuts a 1300 xg i a 4°C.

Dos ml de plasma es van precipitar amb TCA (Àcid Tricloracètic Panreac ref.131067) al 70 % i fred, en una concentració final del 10 % per tal d'extreure les proteïnes de la mostra i conservar-la en un medi àcid i evitar l'oxidació. La barreja es va agitar i es va guardar a 4° durant uns 20 minuts. Passat aquest temps es va separar el precipitat centrifugant a 850 xg 10 minuts a 4°C. El sobrenedant es va aliquotar en tubs de microcentrífuga tipus *ependorf* i es va guardar al congelador (-20°C) per determinar el glutatió reduït i oxidat posteriorment.

Una suspensió 1:20 amb PBS (8 g/l NaCl Prolabo ref.27810295, 0,2 g/l KCl Panreac ref.141494, 2 g/l Na₂HPO₄ Panreac ref.131679, 0,15 g/l KH₂PO₄ Panreac ref.131509, pH 7,4) dels eritròcits rentats es va utilitzar per fer el test d'hemòlisi.

Per determinar la GST, els eritròcits restants es van lisar amb 20 volums de tampó fosfat Na 10 mM (Na_2HPO_4 Panreac ref.131679 – NaH_2PO_4 Panreac ref. 131677) pH 6,25 EDTA 1 mM, i l'hemoglobina es va separar barrejant la preparació hemolisada amb Sephadex 1:100 (Sephadex CM50 Pharmacia Biotech ref.17-0220-01) durant 3 minuts i amb agitació suau constant. Després de centrifugar-ho a 1300 xg durant 10 minuts a 4°C, la GST es concentra en el sobrenedant, mentre que l'hemoglobina queda retinguda en el Sephadex.

La preparació hemolisada amb hemoglobina també va servir per obtenir les mostres per poder determinar el glutatió reduït i oxidat i les TBARS. El processament de la mostra va ser el següent: 3 ml es van precipitar amb TCA al 70 % en fred a una concentració final del 10 %, la barreja es va agitar enèrgicament i es va deixar 20 minuts a la nevera (4°C). Després es va centrifugar a 850 xg a 4°C durant 10 minuts. El sobrenedant es va dividir en dues parts, 2 ml en un tub per determinar les TBARS i la resta en un tub de centrífuga tipus *ependorf* per determinar el GSH i GSSG de la fracció eritrocitària de la sang. Ambdues alíquotes es van guardar a -20°C mentre se n'esperava la determinació.

La sang total d'aquest tub es va utilitzar per determinar l'hematòcrit i l'hemoglobina.

2.2. TUB D'EDTA

El plasma i els eritròcits es van separar amb el mateix procediment que en el tub d'heparina-liti.

Es van aliquotar 80 μ l de plasma en un tub de centrífuga tipus *ependorf* per determinar posteriorment els productes de la peroxidació (TBARS).

Els eritròcits es van rentar de la mateixa manera que s'ha descrit a l'altre tub.

Les cèl·lules vermelles es van sotmetre a dos processaments diferents. En primer lloc 500 μ l es van dipositar en un tub que es va congelar i descongelar dues vegades a -20°C i s'hi van afegir 5 volums d'aigua destil·lada freda per acabar de lisar els eritròcits. Es va extreure l'hemoglobina amb una solució d'etanol:cloroform (6,25:3,75). Després d'agitar la barreja enèrgicament i centrifugar-la 5 minuts a 1900 $\times g$ a 4°C , la SOD es trobava en la fase del sobrenedant i es va aliquotar en un tub de centrífuga tipus *ependorf* que es va guardar a 4°C . En segon lloc, 250 μ l dels eritròcits rentats es van diluir 1:20 amb aigua bidestil·lada per obtenir el producte hemolisat que conté els enzims CAT, GPx i GR. D'aquest producte se'n van separar 100 μ l per determinar la CAT i la resta per determinar la GR i la GPx. Les dues mostres es van congelar a -20°C fins al moment de ser processades.

3. MÈTODES UTILITZATS

3.1. DETERMINACIÓ DE L'HEMATÒCRIT I L'HEMOGLOBINA

Els valors de l'**hematòcrit** es van obtenir utilitzant de capil·lars que s'omplien de sang total i se centrifugaven a temperatura ambient.

Cada mostra es va fer per duplicat i els resultats es van expressar com a percentatge d'eritròcits en sang total.

La quantitat d'**hemoglobina** continguda en sang total es va determinar mitjançant la reacció de Drabkin (QCA ref.994933) que mescla la sang total amb 250 volums del reactiu. Després d'una espera de 20 minuts a temperatura ambient, la mostra es va llegir en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) a 540 nm. El que llegeix l'espectrofotòmetre prové de l'oxidació de l'hemoglobina a metahemoglobina i la conversió d'aquesta a cianometahemoglobina. Cal construir una recta estàndard concentració:absorbància.

Cada mostra es va fer per duplicat i el resultat es va expressar amb grams d'hemoglobina per cada 100 ml de sang. La determinació de l'hemoglobina té com a objectiu poder referir tots els altres paràmetres per gram d'hemoglobina.

A continuació, es detallen els mètodes dels diferents biomarcadors estudiats classificats segons la figura 6 de la introducció.

3.2. DETERMINACIÓ D'INHIBIDORS: ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

3.2.1. GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT

L'equilibri GSSG/GSH es va mesurar per fluorimetria amb el mètode d'Hissin i Hilf (*Analytical Biochemistry*, 1976) amb l'ajuda d'un espectrofluorímetre (Perkin Elmer LS 50B) a una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i 420 nm de longitud d'ona d'emissió.

El **glutatió reduït** reacciona amb l'O-phtalaldehid (OPT Merck ref.11452) a un pH de 8. La mostra, que es tenia congelada en un medi àcid, es va diluir 1:10 amb un tampó fosfat sòdic ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ Panreac ref.131679 - NaH_2PO_4 Panreac ref.131677) pH 8 100 mM i EDTA 5 mM. Es va fer una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció amb mostra (100 μl) i tampó fosfat sòdic (1,8 μl). S'hi van barrejar 100 μl d'OPT i després d'una incubació de 15 minuts es va fer la lectura al fluorímetre amb les condicions especificades a l'inici d'aquest apartat.

El **glutatió oxidat** també reacciona amb l'OPT i dóna fluorescència, però a pH 12. A pH 8, com ja s'ha comentat, el GSH reacciona amb l'OPT; ara bé, per sobre d'aquest pH, el GSH s'oxida i això ens faria augmentar el valor del GSSG. Per tant, el primer que es va fer per determinar el glutatió oxidat va ser incubar la mostra amb N-etil-maleïmida (NEM Merck ref.1308) durant 25 minuts, la qual cosa en va impedir l'oxidació. Després es va diluir 1:10 amb el tampó NaOH 0,1 N que ens va aportar el pH bàsic desitjat.

La mostra es va tornar a diluir, aquest cop 1:20, a la cubeta, s'hi va afegir l'OPT i, després d'una incubació de 15 minuts, es va fer la lectura al fluorímetre amb les condicions ja descrites.

És important, en cada sessió, afegir un estàndard o una recta estàndard si els tampons són nous, que ens validi els resultats obtinguts per poder determinar la concentració de la mostra. Els resultats es van expressar en $\mu\text{mols/g Hb}$ i nmols/ml plasma, i la relació entre tots dos paràmetres es calcula mitjançant el quocient entre el valor del GSSG i el del GSH. També cal tenir la precaució de posar un duplicat per cada mostra sempre que sigui possible, en totes les determinacions.

3.3. DETERMINACIÓ D'INHIBIDORS: ENZIMS I MACROMOLÈCULES

3.3.1. SUPERÒXID DISMUTASA

L'activitat enzimàtica es va mesurar mitjançant el mètode de Misra i Fridovich (*J Biol Chem*, 1972) basat en l'autooxidació de l'epinefrina.

Els superòxids formats oxiden l'epinefrina formant l'adenocrom. Això es pot seguir espectrofotomètricament a 480 nm. La SOD transforma els superòxids fins a peròxid d'hidrogen i oxigen i així evita la formació d'adenocrom.

El primer pas és avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina. Per això es van barrejar 2,5 ml del tampó Na_2CO_3 (Merck ref.6392) - NaHCO_3 (Probus ref.2030) 50 mM pH 10,2 EDTA (Titriplex®III Merck ref.8418.0100) 0,1 mM amb 300 μl d'aigua bidestil·lada i 200 μl d'epinefrina 6mM (Sigma ref.E-4375) en HCl 1mM. La lectura es va fer cada 40 s i durant 23 min a 30°C en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) a 480 nm. Seguidament es van fer les dilucions apropiades de la mostra per tal de trobar la concentració que inhibeix el 50 % de la formació de l'adenocrom (I_{50}). A la cubeta es va barrejar 2,5 ml de tampó, 300 μl de les dilucions corresponents i 200 μl d'epinefrina, i la lectura es va realitzar a l'espectrofotòmetre com s'ha descrit anteriorment.

El resultat es va expressar en unitats/g Hb, on una unitat és la quantitat de mostra que inhibeix en un 50 % la transformació de l'epinefrina en adenocrom a pH alcalí.

3.3.2. GLUTATIÓ PEROXIDASA

A partir de la preparació hemolítica 1:20 es van fer les determinacions dels enzims GPx, GR i CAT. Tant la GPx com la GR es van determinar seguint el mètode descrit per Weeler i col·ls. (*Analytical Biochemistry*, 1990) que valora el nivell de desaparició del NADPH o NADP^+ .

En una cubeta de 3 ml es van barrejar 1,8 ml de tampó fosfat potàssic (KH_2PO_4 Panreac ref.131509 - K_2HPO_4 Probus ref.1461) 100 mM pH 7,5 EDTA 0,5 mM amb 120 μl de l'hemolisat 1:20.

Tot seguit, s'hi van afegir 30 μl de NADPH (Sigma ref.N-7505) 20 mM, 100 μl de GSH 60 mM i 4 μl de glutatió reductasa (GR Fluka ref.49755) que aporten 1 U de glutatió reductasa per cubeta. La barreja es va incubar 5 minuts a 37°C, després s'hi van afegir 100 μl d'hidroperòxid de Cumè (Sigma ref.B-2633) 36 mM. La lectura es va fer a 340 nm en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) cada minut durant 5 minuts; això ens va permetre veure la desaparició del NADPH (coeficient d'extinció molar 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$ (μmols de NADPH transformats).

3.3.3. CATALASA

El mètode de Cohen i col·ls. (*Anal Biochem*, 1970) és el que es va utilitzar per determinar la catalasa.

Amb els 100 μl d'hemolitzat 1:20 que s'havien guardat al congelador es va fer una dilució 1:5 addicional amb aigua destil·lada.

En una cubeta de quars de 3 ml es van barrejar 2,980 ml d' H_2O_2 (solució de peròxid d'hidrogen Merck ref.8599) 19 mM (amb també fosfat potàssic 100 mM (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) pH 7,5) amb 20 μl de la mostra. El que interessa és veure el grau de desaparició del peròxid d'hidrogen en els primers 30 s. Per fer-ho, es va utilitzar un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Lambda 2) amb lectura a 240 nm.

Es va calcular el decrement/minut i els resultats es van expressar en $\text{mmol}/\text{min}/\text{g Hb}$ (fa referència a mmol de H_2O_2 transformats).

3.3.4. GLUTATIÓ REDUCTASA

En una cubeta de 3 ml es van barrejar 1,8 ml de tampó fosfat potàssic (descriu ja en el mètode de la GPx), 120 µl de l'hemolisat 1:20 i 100 µl de glutatió oxidat 75 mM. Després d'incubar durant 5 minuts a 37°C, s'hi van afegir 30 µl de NADPH i es va llegir immediatament a l'espectrofotòmetre en les mateixes condicions que en la determinació de la GPx. El que veiem ara, però, és la generació de NADP⁺ a partir del NADPH durant la reducció del GSSG (Goldberg, *Methods of Enzymatic Analysis*, 1983).

Es va calcular l'increment/minut i els resultats es van expressar en µmol/min/g Hb (µmols de NADP⁺ generats).

3.3.5. GLUTATIÓ S-TRANSFERASA

L'activitat de la GST es va mesurar amb el mètode de Habig i col·ls. (*Journal of Biological Chemistry*, 1974). L'enzim es va determinar mesurant la velocitat de formació del conjugat dinitrofenilglutatió a partir del GSH i del CDNB. La reacció contenia 1-clor-2,4-dinitrobenzè 30 mM (CDNB Sigma ref.C-6396) i GSH 30 mM (Glutathion Sigma ref.G-4251) com a substrats de tots els isoenzims de la GST. Es va utilitzar un tampó fosfat Na⁺ 10 mM pH 6,25 EDTA 1 mM.

L'hemolisat lliure d'hemoglobina es va dividir en dos tubs. Un es va fer servir per determinar l'activitat GST total i l'altre per determinar la fracció termoestable de la GST. Per assolir aquest objectiu, una porció es va mantenir a 4°C mentre que l'altra es va escalfar a 52°C durant 25 minuts.

La dilució de la mostra a la cubeta va ser 1:6 en el cas de la determinació de l'activitat enzimàtica total i 1:3 en el cas de la termoestable, en un volum final de 3 ml per cubeta. En cada cubeta es van posar 100 µl de GSH i després d'una incubació de 5 minuts, s'hi van afegir 100 µl del substrat electrofílic CDNB. Es va determinar també la formació espontània de conjugats, és a dir, sense la intervenció de la GST.

L'activitat es va calcular monitoritzant en un espectrofotòmetre (Perkin Elmer Labda 2) l'increment d'absorbància a 340 nm (coeficient d'extinció molar=9,6mM⁻¹cm⁻¹) realitzant lectures cada 60 s durant 5 minuts en total.

Es va calcular l'increment/minut de l'activitat GST total i de la termoestable expressada en µmol/min/g Hb (fa referència als µmols de CDNB conjugats). També es va calcular el percentatge de GST termoestable sobre la total i s'anomenà % de GST residual.

3.4. DETERMINACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA: TBARS

Les TBARS es van determinar amb el mètode de Buege i Aust (*Methods in Enzymology*, 1978) però mesurant la fluorescència en un espectrofluorímetre Perkin Elmer LS 50B a 515 nm de longitud d'ona d'excitació i 548 nm de longitud d'ona d'emissió, tal com descriuen Richard i col·ls. (*Clinical Chemistry*, 1992).

Primer de tot, es van diluir les mostres amb sèrum fisiològic. En el cas dels eritròcits es va fer una dilució 1:2 i pel plasma se'n va fer una 1:50. Seguidament, es va barrejar 1 ml de la mostra diluïda amb 2 ml d'una solució TCA-TBA-HCl: àcid tricloracètic al 15 %, àcid tiobarbitúric al 0,375 % (Merck ref.8180) i àcid clorhídric 0,25 N (Probus ref.17750 35 %). Aquesta barreja es va posar 15 minuts a ebullició (100 °C) i es va refredar amb gel. Després es va centrifugar a 1900 xg durant 10 minuts a 4°C. Finalment, es va recollir el sobrenedant que es va llegir al fluorímetre.

L'estàndard utilitzat va ser el bis-dietilacetal malonaldehid (d=0,92 kg/l) en diferents concentracions. La recta obtinguda va servir per determinar la concentració de la mostra. Els resultats es van expressar en nmols/g Hb i nmol/ml plasma.

3.5. DETERMINACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ: TEST D'HEMÒLISI

El test d'hemòlisi utilitza una solució de peròxid d'hidrogen per conèixer la resistència dels eritròcits a l'hemòlisi. Per dur a terme aquest test es treballa amb eritròcits nets diluïts 1:20 amb PBS (Farrell i col·ls., *J Clin Invest*, 1977).

Per saber l'hemòlisi espontània que es produeix, els eritròcits 1:20 es van diluir, de nou, 1:2, en PBS fins a un volum total de 600 µl (tub 1). En un altre tub (tub 2), es van fer reaccionar 300 µl de la dilució d'eritròcits amb un 2 % de peròxid d'hidrogen en un volum total de 600 µl per veure la resistència de les membranes a l'hemòlisi. I, finalment, per saber l'hemòlisi total de la mostra, es van posar 300 µl de la dilució 1:20 d'eritròcits i 3,8 ml d'aigua destil·lada (tub 3).

Els tubs 1 i 2 es van fer per triplicat per saber el resultat als 60, 120 i 180 minuts d'incubació a 37 °C. El tub 3 representa l'hemòlisi total de la mostra que en els càlculs es considera d'un 100%.

Després de la incubació de 60, 120 o 180 minuts es va afegir el PBS necessari perquè tots els tubs tinguessin un volum final de 4,1 ml. Es van centrifugar durant 3 minuts a 500 xg a temperatura ambient per sedimentar els eritròcits que hi restaven. La lectura de les cubetes es va realitzar en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 2 a 405 nm de longitud d'ona.

Els resultats es van expressar com a % d'hemòlisi. Aquesta quantitat indica la feblesa de la membrana dels eritròcits, mitjançant la mesura de l'hemoglobina alliberada per les cèl·lules vermelles, eliminant la que s'allibera per efectes de la tècnica, i respecte a l'hemòlisi total obtinguda en el tub 3.

4. PUNTUACIÓ GLOBAL DEL DISTRÈS OXIDATIU

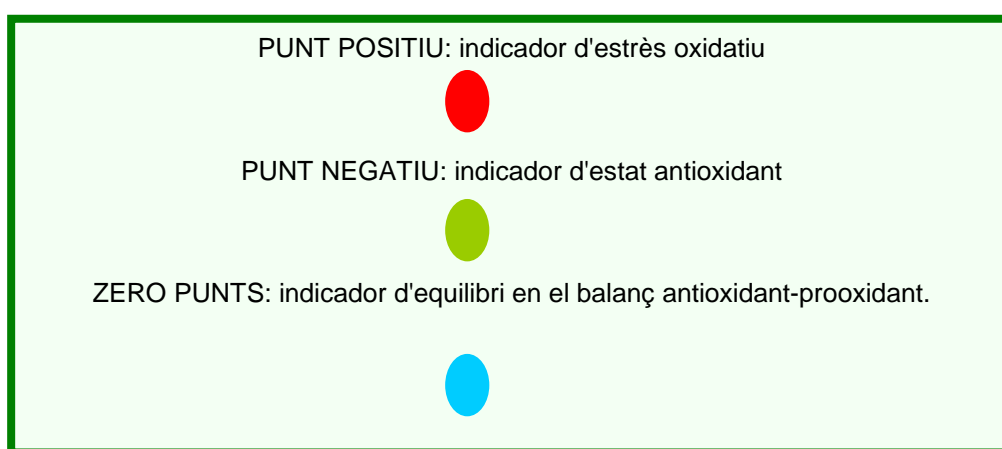
Per poder determinar el nivell de distrès oxidatiu de cada individu, cada biomarcador estudiat va rebre un valor numèric [0, +1 o -1 punts] depenent del valor del resultat en relació als límits de normalitat de la població control i als següents criteris:

- si el valor del paràmetre es trobava dins del rang de normalitat de la població control, s'assignaven 0 punts [0]
- si el valor del paràmetre, per damunt o per sota dels rangs de normalitat, era indicatiu d'estrès oxidatiu s'assignava un punt positiu [+1]
- si el valor del paràmetre, per damunt o per sota dels rangs de normalitat, era indicatiu d'estat antioxidant s'assignava un punt negatiu [-1]

La suma dels valors obtinguts en cada un dels biomarcadors dóna com a resultat una puntuació per a cada individu.

Com veurem més endavant, en el model de puntuació del distrès oxidatiu (PDO) també es van tenir en compte les relacions que hi pot haver entre alguns d'aquests paràmetres. L'assignació d'aquesta puntuació es va basar, doncs, en criteris estadístics i bibliogràfics.

En el treball previ de suficiència investigadora (Romeu, 2002), es van descriure les múltiples relacions existents entre els biomarcadors que també s'estudien en aquesta tesi. Tal com es va comentar en l'anterior treball, els biomarcadors estaven molt correlacionats entre ells i l'estudi estadístic de les variables predictorres també va evidenciar l'existència d'aquestes relacions.



Taula VI. Representació del codi utilitzat per determinar l'estat del balanç prooxidant-antioxidant i puntuació atorgada en cada una de les situacions de distrès o equilibri oxidatiu en el model de puntuació.

4.1. PUNTUACIÓ D'INHIBIDORS: ANTIOXIDANTS DE BAIX PES MOLECULAR

4.1.1. PUNTUACIÓ DEL GLUTATIÓ OXIDAT/REDUÏT

El sistema del glutatió en plasma no s'ha puntuat ja que el nivell de glutatió plasmàtic no prové només de l'interior de l'eritròcit sinó que també pot contenir l'excés del glutatió d'altres teixits. Això dificulta la interpretació dels resultats.

El glutatió existeix en dues formes, reduït (GSH) i oxidat (GSSG), que en condicions normals es troben en equilibri. El GSH és fàcilment oxidat, per això, l'acetilació del grup tiol estabilitza la molècula i n'augmenta la seva biodisponibilitat *in vivo*. Aquesta biodisponibilitat és la que marca el grau d'estrès oxidatiu, és a dir, molt glutatió oxidat i poc de reduït indica estrès oxidatiu. De la mateixa manera, si es dona el cas contrari, la protecció davant dels radicals lliures està augmentada.

◦ GSH eritròcit

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt d'estat antioxidant (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt positiu (●).

◦ **GSSG eritròcit**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt d'estat antioxidant (●).

◦ **GSSG/GSH eritròcit**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt d'estrès oxidatiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt d'estat antioxidant (●).

4.2. PUNTUACIÓ D'INHIBIDORS: ENZIMS I MACROMOLÈCULES

4.2.1. PUNTUACIÓ DE LA SUPERÒXID DISMUTASA

La SOD té un paper específic de protecció de les cèl·lules, per eliminació catalítica de l'ió superòxid. Si aquests mecanismes no funcionen adequadament, els radicals lliures poden iniciar la peroxidació lipídica i obtenir un producte final com les TBARS que reflecteixen el dany cel·lular per radicals lliures. Un nivell alt de SOD és indicador d'estrès oxidatiu i no només com a resposta a l'increment de producció dels superòxids sinó també arran de la producció del H_2O_2 que és una molècula prooxidant.

Un nivell baix ens indica un estat de normalitat o de repòs oxidatiu, sempre que aquest valor no vagi acompanyat d'altres indicadors d'estrès oxidatiu com una GST termoestable baixa, alts nivells de glutatió oxidat, una excessiva hemòlisi o productes de la peroxidació lipídica per sobre de la normalitat, en aquest últims supòsits es considera que no hi ha prou activitat de la SOD i per això hi ha altres signes d'estrès oxidatiu.

◦ **SOD**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu (●), si el valor és menor al límit inferior els punts rebuts són zero (●), excepte quan es troba acompanyada d'una GST residual baixa i/o de les TBARS altes i/o del GSSG eritrocitari alt i/o de l'hemòlisi alta, en aquest cas la puntuació rebuda és d'un punt d'estrès oxidatiu (●).

S'ha optat per aquesta puntuació a partir de dades bibliogràfiques (Halliwell, *Br J Exp Path*, 1989; Harman, *Ann New York Acad Sciences*, 1994; Herrera i col·ls., *Am J Kidney Diseases*, 2001) i l'estudi de les correlacions dels diferents biomarcadors de la població control, en concret la SOD és correlaciona amb les TBARS eritrocitaris de manera significativa amb una r de Pearson de -0,292; indicant que hi ha una major producció de TBARS quan l'activitat de la SOD és més baixa. El mateix passa amb el GSSG i GSSG/GSH eritrocitari amb una r de Pearson de -0,206 i -0,161 respectivament.

D'altra banda, en els estudis de predicció els valors de les TBARS eritrocitaris estan correlacionats amb la SOD eritrocitària entre altres biomarcadors.

4.2.2. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ PEROXIDASA

La glutatió peroxidasa és un altre dels sistemes defensius de l'organisme davant dels radicals lliures. És un enzim que conté seleni i que descompon el peròxid d'hidrogen, igual que la catalasa, en aigua i oxigen. En l'eritròcit, la GPx actua davant el H_2O_2 si la CAT no pot neutralitzar-lo (Junod, *Intensive Care Med*, 1989). Per tant nivells alts d'aquest enzim indiquen un estrès oxidatiu, mentre que si es troba en nivells baixos, és indicador d'un estat antioxidant, sempre que aquest valor no vagi acompanyat d'altres indicadors d'estrès oxidatiu com una GST termoestable baixa, alts nivells de GSSG/GSH eritrocitari, una hemòlisi excessiva o productes de la peroxidació lipídica per sobre de la normalitat.

◦ **GPx**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt d'estat antioxidant (●), excepte quan es troba acompanyada d'una GST residual baixa i/o de les TBARS altes i/o del GSSG/GSH eritrocitari alt i/o de l'hemòlisi alta, en aquest cas la puntuació rebuda és d'un punt d'estrès oxidatiu (●).

4.2.3. PUNTUACIÓ DE LA CATALASA

La catalasa és un altre dels sistemes defensius de l'organisme davant dels radicals lliures. El peròxid d'hidrogen es forma com un dels productes finals del metabolisme oxidatiu aeròbic dels hidrats de carboni. Si es deixa acumular, el peròxid d'hidrogen és letal per a les cèl·lules. La catalasa, doncs, descompon el peròxid d'hidrogen en oxigen i aigua. Per tant nivells alts d'aquest enzim indiquen un estat antioxidant, excepte quan hi ha biomarcadors d'estrès oxidatiu com quan hi ha més producció de peròxid d'hidrogen per una SOD augmentada, o hi ha una GPx alta com a resposta d'una major producció de H_2O_2 i un GSH eritrocitari baix, en aquestes situacions es considera que la CAT està augmentada com a resposta a un estat d'estrès oxidatiu. Quan es troba en nivells baixos, és indicador d'estrès oxidatiu.

Tant la SOD com la catalasa són sistemes defensius davant els radicals lliures, no obstant, nivells alts de SOD reben un punt d'estrès oxidatiu i nivells alts de catalasa reben un punt negatiu. Aquesta puntuació aparentment contradictòria s'explica pel fet que la SOD detoxifica un radical lliure i en forma un altre, el peròxid d'hidrogen, per tant, la SOD perd la seva característica detoxificadora si no va acompanyada d'altres sistemes que eliminen el peròxid que forma. En canvi, la catalasa elimina el peròxid d'hidrogen formant productes que no tenen característiques de radicals lliures.

◦ **CAT**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt negatiu (●), excepte quan es troba acompanyada d'una SOD amb un punt d'estrès oxidatiu i/o una GPx alta i/o un GSH eritrocitari baix, en aquest cas la puntuació rebuda és d'un punt d'estrès oxidatiu (●). Si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt positiu (●).

4.2.4. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ REDUCTASA

L'organisme manté nivells adequats de GSH per l'acció de la glutatió reductasa, a partir del glutatió oxidat, amb el NADPH. Una GR augmentada és indicadora d'estat antioxidant sempre que no hi hagi un nivell alt en el quocient GSSG/GSH, ja que llavors considerem que hi ha un estrès oxidatiu i la GR augmenta per restablir l'equilibri entre GSSG i GSH. Mentre que si els nivells de GR són baixos és considera, tal i com succeeix amb la CAT i la GST que no hi ha mecanismes de defensa suficients i per tant hi ha un estrès oxidatiu.

◦ **GR**

El valor alt de GR rep una puntuació d'un punt negatiu (●) sempre que no vagi acompanyat d'un GSSG/GSH alt, en aquest cas rep un punt d'estrès oxidatiu (●), tan si el resultat sobrepassa el límit superior com si no arriba al límit inferior.

4.2.5. PUNTUACIÓ DE LA GLUTATIÓ S-TRANSFERASA

Els xenobiòtics s'eliminen mitjançant l'addició del glutatió (GSH), a través del seu grup sulfhidril, amb un carboni electrofílic del xenobiòtic. Aquesta reacció és catalitzada per la glutatió-S-transferasa i el mateix glutatió és el cofactor d'alta energia. Com hem dit, el glutatió és un tripèptid de glu- cis-gli. La cisteïna del GSH unida al radical lliure, posteriorment s'acetila i aquesta cisteïna acetilada és l'àcid mercaptúric, el qual s'excreta per l'orina. Aquesta reacció és important per la detoxificació d'epòxids i peròxids. El GSH actua com a antioxidant mitjançant tres mecanismes diferents: evitant la peroxidació a través de la GPx, eliminant tòxics per si sol, sense cap cofactor, i actuant com a substrat per l'eliminació de tòxics juntament amb la GST. Si la reacció de conjugació de la GST disminueix massa el nivell cel·lular del glutatió, a causa de l'excés de xenobiòtics, l'organisme pot sofrir danys considerables ja que deixen de funcionar aquestes tres vies de detoxificació. En conclusió, nivells alts de GST total i termoestable indiquen protecció i nivells baixos disminueixen la capacitat detoxificadora, és a dir, indiquen estrès oxidatiu.

Per altra banda però, com hem dit, si el nivell de glutatió és baix, i encara que la GST total o termoestable sigui alta, ens trobem en un estat d'estrès oxidatiu, hi ha manca de substrat. Així mateix, encara que els nivells de GST total siguin alts, si la GST termoestable, és baixa, no ens trobem en un estat de protecció antiradicalar sinó tot el contrari. Cal remarcar, doncs, la labilitat d'aquest enzim, que en estat oxidat no funciona correctament en no poder formar conjugats amb les proteïnes tal com fa quan està reduït. I en relació a aquest fet també considerem una excepció si el GSSG és alt i la GST total està augmentada per un fet d'adaptació a un estat oxidatiu de l'eritròcit.

- **GST total**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt negatiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt positiu (●). També ha rebut un punt positiu quan, essent el valor del paràmetre superior al límit més alt, el GSSG eritrocitari supera el màxim del rang establert per la normalitat o la GST termoestable està per sota del límit inferior o el GSH eritrocitari és baix (●).

◦ **GST termoestable**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt negatiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt d'estrès oxidatiu (●).

◦ **% GST residual**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt d'estat antioxidant (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix s'ha aplicat un punt positiu (●).

4.3. PUNTUACIÓ DELS PRODUCTES DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA

La peroxidació lipídica es mesura amb la determinació de les TBARS, per tant, si es troba en nivells elevats, indica que hi ha dany cel·lular.

◦ **TBARS plasma**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix els punts rebuts són zero (●).

◦ **TBARS eritròcit**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt d'estrès oxidatiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix els punts rebuts són zero (●).

4.4. PUNTUACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT D'OXIDACIÓ

Tal com el seu nom indica, l'hemòlisi és el trencament dels glòbuls vermells. Els glòbuls vermells viuen normalment durant 110 o 120 dies, després moren i es descomponen. Algunes malalties i processos poden produir la descomposició prematura dels glòbuls vermells i deixar una quantitat menor que la normal per al transport d'oxigen. Aquesta ruptura dels eritròcits amb alliberament d'hemoglobina al plasma es produeix com a conseqüència de la unió antígen-anticòs, reacció transfusional, de lesions mecàniques, de trastorns osmòtics, enzimàtics, tòxics, alteracions congènites dels eritròcits, en anomalies de l'hemoglobina o en infeccions. Així doncs, els radicals lliures són una de les possibles causes d'hemòlisi que, si es troba augmentada respecte la situació normal, indica que existeix estrès oxidatiu. El que veiem amb el mètode utilitzat per determinar l'hemòlisi és el comportament dels glòbuls vermells, o la resistència de la seva membrana, quan es posen amb contacte amb un productori de radicals lliures com és el peròxid d'hidrogen.

◦ **Hemòlisi**

Un resultat per sobre del nivell superior ha rebut un punt positiu (●), mentre que si el valor és inferior al límit més baix els punts rebuts són zero (●).

L'assignació de punts de cada paràmetre de cada individu, i la suma total per individu es realitza mitjançant complexes fórmules lligades al full de càlcul d'*Excell* (*Microsoft Excell, MS Office 2000*) on tenim els resultats de totes les analítiques realitzades. Les fórmules permeten puntuar cada paràmetre segons els requeriments que s'han detallat en aquest apartat, i estan sempre referides als rangs de normalitat obtinguts de la població d'estudi (95 % de la població, límit inferior i superior, taula VIII) El conjunt de fórmules es pot aplicar a qualsevol base de dades de paràmetres lligats a l'estrès oxidatiu de qualsevol població, patològica o sana, així com de manera individual a pacients que necessitin, per la seva situació, saber l'estat del balanç oxidant-antioxidant del seu organisme.

El resultat final d'aquest càlcul és una nova variable per afegir als diferents paràmetres d'estudi del nostre treball i l'anomenem: **Puntuació de Distrès Oxidatiu (PDO)**

En la següent taula (taula VII) es presenta un resum de la puntuació aplicada per a cada paràmetre i segons les diferents situacions que s'han esmentat fins ara:

Taula VII. Resum de les puntuacions assignades a cada cas en els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu.

BIOMARCADOR	ALT (>límit superior) BAIX (<límit inferior)	PDO	BIOMARCADOR	ALT (>límit superior) BAIX (<límit inferior)	PDO
TBARS PLASMA	Alt	+1	HE	Alt	+1
	Baix	0		Baix	0
TBARS ERITRÒCIT	Alt	+1	SOD	Alt	+1
	Baix	0		Baix	0
GSH PLASMA	Alt	0	+ GST termoestable baix		+1
	Baix	0		+ TBARS alt	+1
GSSG PLASMA	Alt	0	+ GSSG eritròcit alt		+1
	Baix	0		+ Hemòlisi alt	+1
GSSG/GSH PLASMA	Alt	0	CAT	Alt	-1
	Baix	0		+ GSH eritròcit baix	+1
GSH ERITRÒCIT	Alt	-1	+ GPx alt		+1
	Baix	+1		SOD +1	+1
GSSG ERITRÒCIT	Alt	+1	Baix		+1
	Baix	-1		Alt	-1
GSSG/GSH ERITRÒCIT	Alt	+1	GR	+ GSSG/GSH alt	+1
	Baix	-1		Baix	+1
T-GST	Alt	-1	GPx	Alt	+1
	+ GSSG eritròcit alt	+1		Baix	-1
	+ GST termoestable baix	+1		+ GSSG/GSH alt	+1
	+ GSH eritròcit baix	+1		+ GST termoestable baix	+1
TS-GST	Baix	+1	+ Hemòlisi alt		+1
	Alt	-1		+ TBARS alt	+1
R-GST	Alt	-1			
	Baix	+1			

5. ESTUDI ESTADÍSTIC

Els resultats s'han tractat estadísticament amb el programa SPSS v.13 (*Statistical Package for the Social Sciences*) per a Windows. S'han fet les anàlisis següents:

- Descriptius: n de la mostra, valors màxims, valors mínims, mitjana de la població, desviació estàndard, interval de confiança del 95 % (rang de valors on es troben representats el 95 % dels individus de la població).
- Prova de Kolmogorov-Smirnov: s'ha usat aquesta prova estadística per contrastar la hipòtesi de distribució normal de cada variable. El nivell de significació ha estat $p=0,05$.
- Prova F de Fisher-Snedecor: s'ha usat per comprovar la homogeneïtat de variàncies.
- Prova t de Student-Fisher per a dues mostres independents: utilitzat com a mètode de comparació de mitjanes de dos grups, el nivell de significació s'ha establert en 0,05.
- ANOVA d'un factor (anàlisi de la variança): procediment estadístic utilitzat per a la comparació de mitjanes de més de dos grups, el nivell de significació s'ha mantingut en 0,05 i s'ha aplicat el mètode de Scheffé per calcular la significació de totes les parelles de grups.

- En els paràmetres no normals s'han aplicat les tècniques no paramètriques corresponents: U de Mann-Whitney per a la comparació de dos grups i Kruskal-Wallis quan comparem més de dos grups. El nivell de significació també ha estat situat a 0,05.
- Prova *t* de Student-Fisher per a dues mostres aparellades: utilitzat com a mètode de comparació de mitjanes de dues situacions diferents en un mateix grup d'individus, el nivell de significació s'ha establert en 0,05.
- ANOVA de mesures repetides dins el model lineal general: procediment estadístic utilitzat per a la comparació de mitjanes de més de dues situacions diferents en un mateix grup d'individus, el nivell de significació s'ha mantingut en 0,05 i s'ha aplicat el mètode de contrast simple i repetit per a les comparacions múltiples.
- En els paràmetres no normals s'han aplicat les tècniques no paramètriques corresponents: test de Wilcoxon per a la comparació de dos grups relacionats i de Friedman quan comparem més de dos grups relacionats entre ells. El nivell de significació també ha estat situat a 0,05.
- Correlacions bivariades: les correlacions mesuren la relació entre variables, el test ens dona el coeficient de correlació de Pearson que mesura l'associació lineal entre dues variables. La prova de significació ha estat bilateral ja que no es coneixia prèviament la direcció de l'associació entre variables.

- **Predicció: regressió lineal mitjançant passos successius.** La regressió lineal estima els coeficients de la equació lineal, amb una o més variables independents, que millor predigui el valor de la variable dependent. L'anàlisi mitjançant passos successius permet examinar les variables en cada pas per introduir-les o eliminar-les. L'anàlisi ens dona el coeficient de regressió B, la R^2 , el valor F i la probabilitat del valor F.
- **Anàlisi de freqüències:** s'han obtingut estadístics i representacions gràfiques que resulten útils per descriure algunes variables. S'ha utilitzat per descriure, amb percentatges, les freqüències de variables categòriques.
- **Anàlisi discriminant:** l'anàlisi discriminant resulta útil per a construir un model predictiu que pronostiqui el grup de pertinença d'un cas a partir de les característiques observades de cada cas. El procediment genera una funció discriminant basada en les combinacions lineals de les variables predictorres que proporcionen la millor discriminació possible entre els grups. La funció es genera a partir d'una mostra de casos pels que es coneix el grup al qual pertanyen, posteriorment, les funcions poden ser aplicades a nous casos dels quals es desconeix el grup al qual pertanyen. La classificació s'ha realitzat deixant un cas fora i assumint que tots els grups són d'igual mida.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. DISTRÈS OXIDATIU EN CONTROLS SANS

1.1. RANGS DE NORMALITAT

Per valorar el pes del distrès oxidatiu en determinades situacions fisiopatològiques necessitem, en primer lloc, establir els valors de normalitat de cada un dels biomarcadors que considerem que hi estan implicats. A la taula VIII es descriuen els valors mitjans i els rangs de normalitat de cada un dels biomarcadors escollits. Els motius pels quals s'han triat aquest conjunt de biomarcadors es detalla més endavant. Molts paràmetres tenen rangs de normalitat que permeten diferenciar una situació sana d'una situació patològica o no normal, i poder així actuar clínicament per solucionar el problema. Per exemple, valors inferiors a 11mg/dl d'hemoglobina en dones embarassades es considera indicador d'anèmia.

Els rangs de normalitat dels biomarcadors del distrès oxidatiu presentats en el nostre treball també poden ser útils en aquest sentit ja que la mida de la mostra poblacional sana és prou gran, la extracció de la mostra de sang i la seva preparació per valorar els biomarcadors, s'ha fet de manera homogènia i seguint els mateixos protocols i, en general, s'ha procurat minimitzar les variacions intraindividuals dels paràmetres, que puguin ser degudes a la manipulació de la mostra.

**Taula VIII. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control.
 Rangs de normalitat.**

BIOMARCADORS	MITJANA ± DE (n)	LÍMIT INFERIOR-LÍMIT SUPERIOR
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,60±0,48 (163)	0,79-2,63 (163)
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,38±0,24 (146)	0,08-1,00 (146)
R-GST (%)	24,33±14,12 (145)	6,44-63,24 (145)
GSH (µmol/g Hb)	5,11±1,48 (164)	2,79-8,51 (164)
GSSG (µmol/ g Hb)	0,79±0,42 (164)	0,21-1,98 (164)
GSSG/GSH	0,17±0,11 (164)	0,03-0,39 (164)
TBARS (nmol/g Hb)	4,73±3,01 (158)	1,20-12,92 (158)
CAT (mmol/min/g Hb)	222±38 (149)	144-295 (149)
GPx (µmol/min/g Hb)	28,25±8,10 (133)	13,71-49,74 (133)
GR (µmol/min/g Hb)	3,48±1,38 (149)	1,55-7,57 (149)
SOD (U/g Hb)	1763±535 (155)	914-2806 (155)
HE (%)	12,19±4,83 (150)	5,06-21,57 (150)
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	22,48±12,01 (164)	4,47-50,79 (164)
GSSG (nmol/ml)	24,58±7,39 (164)	11,94-40,09 (164)
GSSG/GSH	1,60±1,32 (164)	0,28-5,27 (164)
TBARS (nmol/ml)	1,86±1,11 (163)	0,30-4,76 (163)

Mitjanes, desviacions estàndards i valors de referència dels biomarcadors en el grup control sa. La n és el nombre d'individus. El límit inferior i superior corresponen als percentils 2,5 i 97,5 respectivament.

No obstant, es fa necessari millorar els factors que fan possible l'estandardització dels rangs de normalitat dels paràmetres estudiats de manera que, finalment, aquests rangs puguin ser utilitzats com a referència de valors normals en sang en molts altres estudis.

Per exemple, el moment de l'extracció és molt important, com es demostra en el treball de Singh i col·ls. on a l'estudiar els ritmes circadians dels enzims antioxidants SOD, CAT, GR i GPx van trobar valors diferents depenent del moment en que es va realitzar l'extracció (*Biomed Pharmacother*, 2005). Altres paràmetres com ara l'estil de vida, el sexe i l'edat també tenen importància en el context del distrès oxidatiu (Moller i col·ls., *Chem-Biol Interact*, 1996; Ortin i col·ls., *Med Clin (Barc)*, 1996; Alberg, *Toxicol*, 2002) i haurien de controlar-se de manera estricta, en una base de dades, per construir uns rangs de normalitat d'aplicació universal. Per això, en el nostre treball s'ha estudiat el distrès oxidatiu en homes i dones separatament, en diferents rangs d'edat, i en una situació d'estrès psicològic important, com és el període d'exàmens universitari; d'aquesta manera hem intentat acurar al màxim la nostra base de dades així com controlar els factors externs de producció de RLL, com el tabac i l'exposició a la radiació UV. Els resultats d'aquests estudis es presenten més endavant.

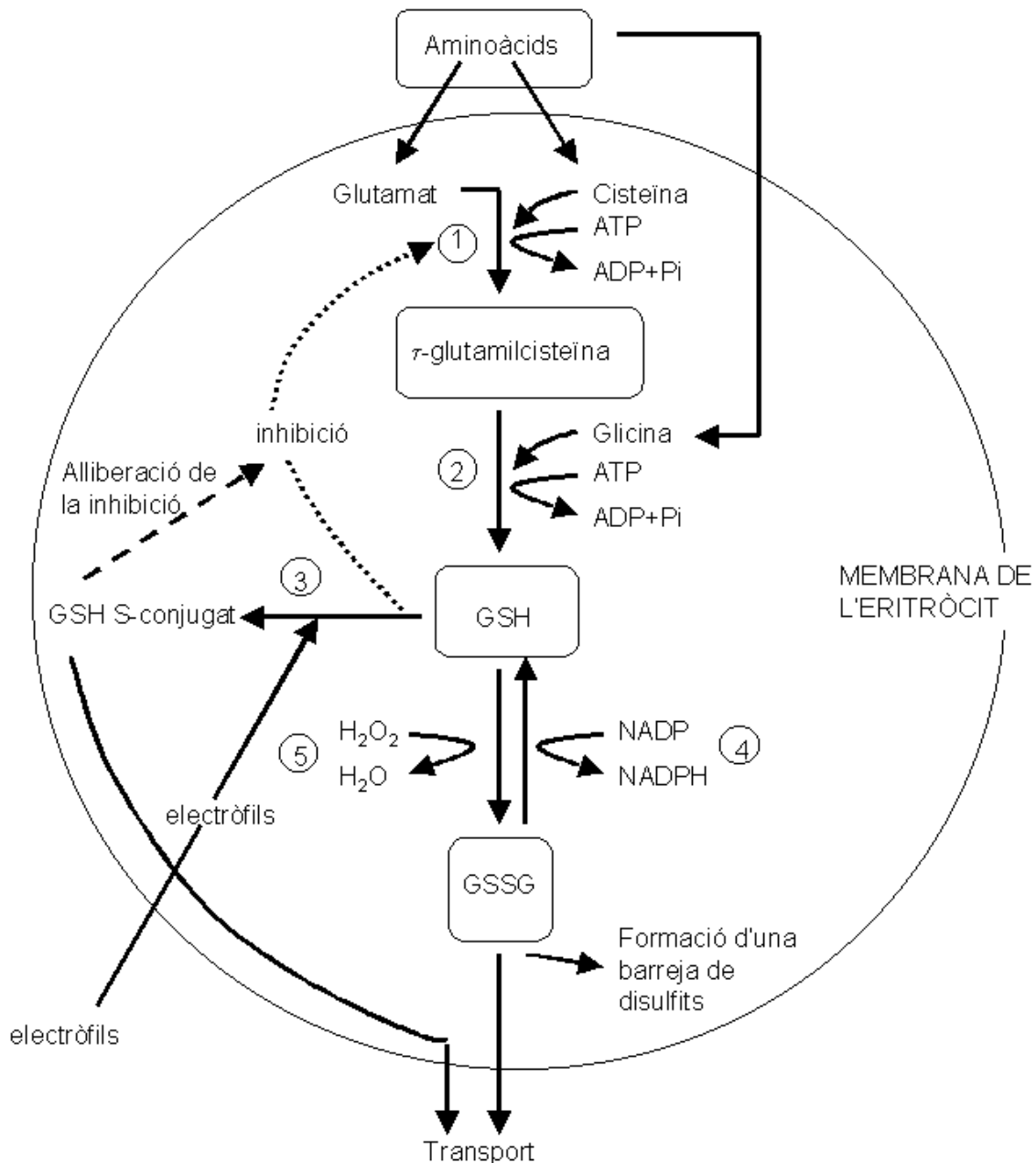
1.2. BIOMARCADORS DEL DISTRÈS OXIDATIU

Per definir una equació que lligui tots els biomarcadors i així tenir un valor global del grau de distrès oxidatiu (**PDO**), s'han d'escollir un conjunt de biomarcadors que representin d'una manera àmplia l'estat de la balança prooxidant-antioxidant. També és important que l'analítica d'aquests paràmetres sigui assequible, tant en temps com econòmicament, perquè pugui ser aplicada com a tècnica de rutina per a la població general. Totes les anàlisis es van fer en sang, separant plasma i eritròcits puix que la sang ens pot donar una idea del que està succeint a la resta de l'organisme i la seva obtenció és fàcil i poc agressiva per a l'individu.

En el nostre treball s'han utilitzat un grup de biomarcadors que valoren els **productes de l'estrès oxidatiu**. No obstant, no s'ha inclòs cap dels **promotors de l'estrès oxidatiu** en la valoració global ja que, tal com s'ha comentat a la introducció, les tècniques que quantifiquen els RLLO i les ERO, són complicades i costoses.

Dels **inhibidors** del dany oxidatiu, que són els **antioxidants de baix pes molecular**, s'ha introduït el glutatió eritrocitari com a biomarcador, ja que és un dels antioxidants endògens més importants. La figura 8 representa la síntesi del glutatió a l'eritròcit i el seu pas al plasma. El glutatió plasmàtic no s'ha inclòs en el PDO perquè no és possible conèixer la seva procedència, cosa que fa que sigui difícil d'interpretar el valor que té en el context global del distrès, tal com ja hem comentat a l'apartat de material i mètodes. Així i tot, s'ha analitzat per tenir més informació de l'estat oxidatiu de l'individu.

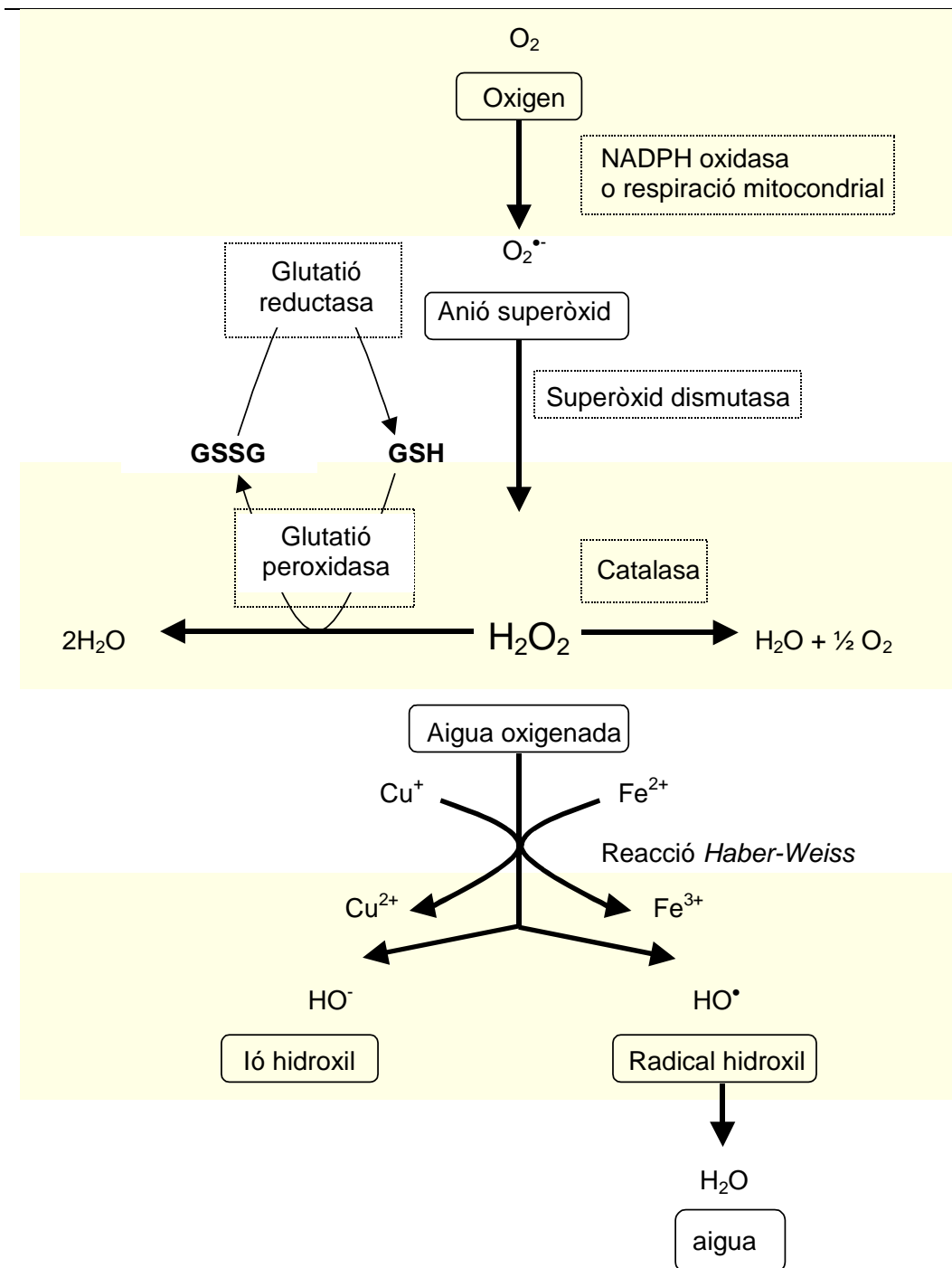
Figura 8. Relacions metabòliques relacionades amb la síntesi del glutatió en eritròcits humans



Extret de Kondo i col·ls., *Eur J Biochem*, 1984. (1) Glutamilcisteïna sintetasa; (2) Glutatió sintetasa; (3) Glutatió S-transferasa; (4) Glutatió reductasa; (5) Glutatió peroxidasa.

Els **enzims inhibidors de l'estrès oxidatiu** que han entrat dins la valoració global del distrès oxidatiu han estat la GST, la SOD, la CAT, la GR i la GPx. Tots aquest enzims actuen a diferents nivells en l'escala de detoxificació radicalar, per això, tal com s'ha comentat a la introducció i com es mostra a la figura següent (figura 9), la informació que ens donen aquests enzims no és repetitiva; a més, a l'estar tots relacionats entre sí, la introducció de tots ells en el PDO ens dóna una idea molt més acurada de l'estat de tot el sistema defensiu.

Figura 9. Principals etapes de formació-eliminació de les ERO



Extret de Urban i col·ls., *Ann Chir*, 1995.

La GST elimina tòxics unint-s'hi, majoritàriament, amb l'ajut del GSH. En els eritròcits, hi ha una isoforma similar a la π , denominada ρ , que té la propietat de conservar parcialment la seva activitat, fins i tot després d'un calentament a 52°C. A aquesta fracció se l'anomena termoestable i ens dóna una idea de la quantitat de GST que podria mantenir la funcionalitat en una situació aguda d'atac radicalar. Així, ambdues quantitats de GST, la GST total (T-GST) i la GST termoestable (TS-GST), s'han inclòs com a biomarcadors en la valoració global, a més del % de GST residual (R-GST).

Les ERO poden afectar les cèl·lules a tots els nivells. Tal com ja s'ha comentat a la introducció, els lípids, les proteïnes i el DNA poden ser alterats per aquestes substàncies. Per això, existeixen índex que avaluen els **productes de la peroxidació** i ens informen sobre el dany que les ERO han provocat. En el nostre treball, tan sols s'ha inclòs la **peroxidació lipídica** (mitjançant la quantificació de les TBARS) en el grup de biomarcadors per a la PDO. La quantificació dels productes resultants de la peroxidació de lípids, fruit d'un estrès oxidatiu, ha estat relacionat àmpliament amb moltes malalties i és, per tant, un factor que s'ha d'incloure en una valoració global del distrès oxidatiu (figura 7).

No obstant, seria important, en el futur, incloure també la **peroxidació proteica**, mesurada amb la quantitat de proteïnes carbonilades, ja que, en algunes situacions, el dany oxidatiu se centra en les proteïnes o n'és una conseqüència molt important (figura 7). Aquesta tècnica ha estat posada a punt i les mostres es processaran en el futur per a incorporar-ho a la bateria actual de paràmetres que s'estudien, però es fa necessari tenir valors de rang de normalitat per incloure'l en el càlcul de la PDO.

No obstant, Dotan inclou dins dels indicadors del dany oxidatiu de pèptids el GSSG, que nosaltres també hem inclòs en l'anàlisi, tant en eritròcit com en plasma (*Prog Lipid Res*, 2004). A més, Griffiths i col·ls. també destaquen el GSSG com a bon biomarcador del dany proteic (Griffiths i col·ls., *Mol Aspects Med*, 2002).

En el nostre treball tampoc s'ha inclòs, de moment, l'**oxidació del DNA** dins dels biomarcadors d'estrès oxidatiu. L'indicador de residus de 8-OHdG sembla ser l'índex més fiable i assequible per valorar el dany oxidatiu als nucleòtids. Tot i això, la majoria de treballs analitzen el contingut d'aquesta molècula en orina (Wu, *Clin Chim Acta*, 2004) i són molt pocs els que ho fan en plasma. Segons Halliwell els resultats d'aquestes determinacions urinàries de 8-OHdG han d'interpretar-se amb cautela ja que, per exemple, l'administració d'un agent pot considerar-se com a "perjudicial" si fa que augmentin els nivells de 8-OHdG quan, en realitat, pot ser un agent "beneficiós" perquè estimula la reparació del DNA. També es considera que les concentracions de 8-OHdG no s'afecten per la dieta i que l'organisme humà no la pot metabolitzar, però no hi ha estudis que corroborin aquestes suposicions. A banda d'això, la 8-OHdG pot derivar, no tan sols del DNA, sinó també de l'oxidació de dGTP prèvia a la incorporació al DNA, i aquesta porció de 8-OHdG no provindria, doncs, del dany oxidatiu. Finalment, Halliwell crida l'atenció sobre els problemes metodològics de la tècnica i els artefactes que pot generar (Halliwell, *Am J Clin Nutr*, 2000). En conseqüència, les tècniques més adequades per valorar la 8-OHdG són tècniques complexes i costoses (HPLC, cromatografia de gassos, espectrometria de masses). Per tots aquest motius la mesura del dany oxidatiu del DNA es fa difícil de realitzar de manera rutinària al laboratori, i el valor informatiu del paràmetre no justifica, de moment, l'esforç que caldria fer per posar a punt la tècnica.

La **susceptibilitat d'oxidació** dels eritròcits mitjançant la mesura del test d'hemòlisi (HE) s'ha inclòs en la valoració global del distrès oxidatiu. La susceptibilitat d'oxidació és un biomarcador més global, que no mesura la quantitat d'ERO, ni d'antioxidants presents, sinó la capacitat de resposta de la cèl·lula a una situació oxidant exògena (en el nostre cas exposició dels eritròcits a peròxid d'hidrogen).

En canvi, la **capacitat antioxidant** mesura la resposta dels sistemes antioxidants, enzimàtics i no enzimàtics, enfront un atac radicalar (en el nostre cas de radicals peroxils) mitjançant la tècnica de l'ORAC. L'ORAC no s'ha inclòs com a biomarcador dins del sistema de valoració global del distrès oxidatiu, la PDO. La tècnica s'ha posat a punt per realitzar l'anàlisi en plasma humà i, en el futur, s'intentarà correlacionar el PDO, obtingut a partir de múltiples biomarcadors, amb la valoració de la capacitat antioxidant total, pel test de l'ORAC. Per poder proposar aquest indicador com a biomarcador "universal" de l'estat de la balança prooxidant-antioxidant de l'organisme humà caldrà veure com es comporta el paràmetre en diferents situacions fisiològiques i patològiques.

En aquest moment, el test de l'ORAC i altres que valoren la capacitat antioxidant, són més utilitzats com a tècniques que quantifiquen les característiques dels aliments segons les propietats antioxidants, ja que a part dels estudis *in vivo*, permeten fer estudis *in vitro* i correlacionar ambdues situacions (Roginsky, *J Agric Food Chem*, 2005; Kampa, *BMC Clinical Pathology* 2002).

2. DISTRÈS OXIDATIU EN INSUFICIÈNCIA RENAL

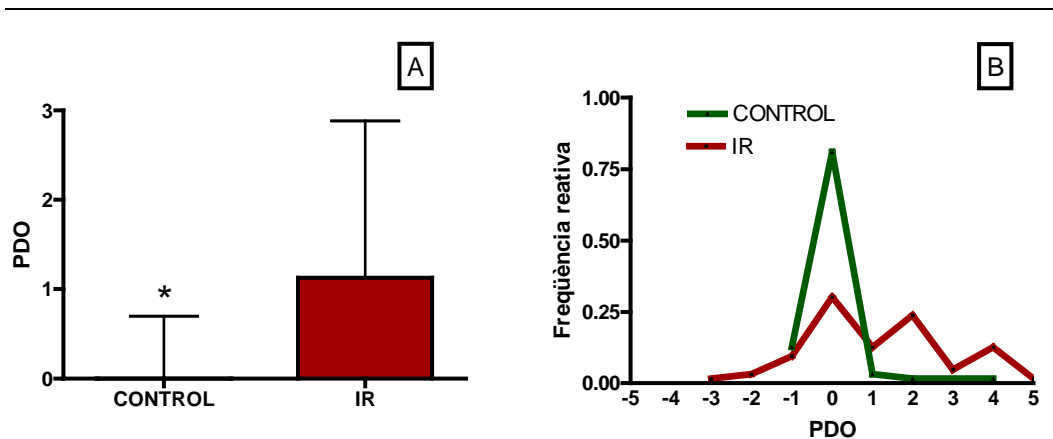
La IR ha estat relacionada amb l'estrès oxidatiu, sobretot en malalts sotmesos a diàlisi (Westhuyzen i col·ls., *Nephron*, 1995; Dursun i col·ls., *Clin Chem Lab Med*, 2002; Salamunic i col·ls., *Clin Chem Lab Med*, 2003).

Els individus del nostre estudi no estaven sotmesos a hemodiàlisi, no obstant van presentar un grau d'estrès oxidatiu significativament més elevat que els controls. La puntuació va ser de $0 \pm 0,7$ punts en el grup control i de $1,1 \pm 1,7$ punts en el grup d'IR (figura 10A).

El grup control estava format per individus procedents del grup control inicial però aparellats en nombre, edat i sexe amb els individus amb IR.

La PDO de la població control presentava una distribució normal centrada en els 0 punts, en canvi, la distribució de freqüències de la PDO en la IR no seguia una distribució normal sinó que la puntuació es desplaçava molt més cap als valors positius, és a dir, d'estrès oxidatiu (figura 10B).

Figura 10. PDO dels grups CONTROL i IR

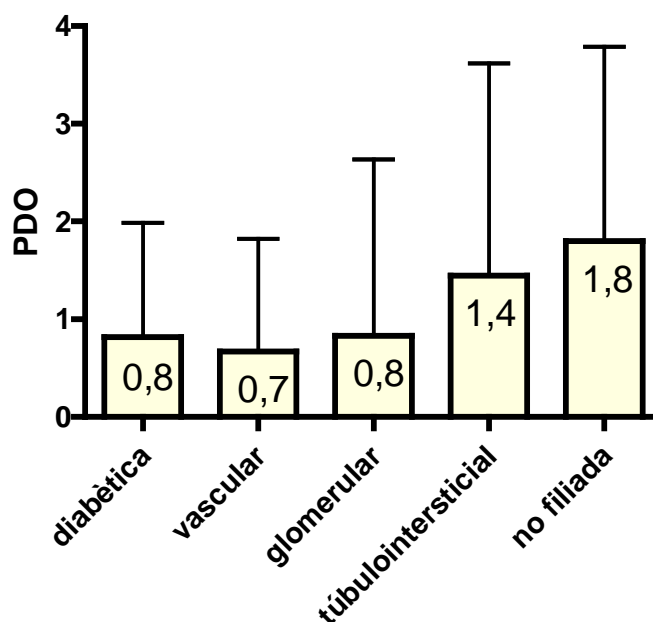


A. Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els grups CONTROL i IR. * indica diferències significatives ($p < 0,005$); B. Distribució de freqüències, relativa a 1, de les PDO dels grups CONTROL i IR.

La etiologia de la IR no era homogènia sinó que, tal com ja s'ha explicat a material i mètodes, vam poder fer cinc subgrups segons la causa de la malaltia renal. No obstant, tal com es mostra a la figura 11, no hi havia diferències significatives entre els valors de PDO de cada subgrup, essent tots ells significativament alts respecte el grup control. Kanauchi i col·ls. van utilitzar la 8-OHdG per mesurar l'estrès oxidatiu i van observar un major dany al DNA en pacients amb IR d'etiologia túbulointersticial que en els individus control, i també un augment no significatiu en els pacients amb etiologia glomerular. En el nostre treball, els grups amb malaltia renal d'origen túbulointersticial i glomerular mostren un estrès oxidatiu significativament superior al grup control, essent el túbulointersticial el que en presenta el major grau.

Per tant, la 8-OHdG, biomarcador del dany oxidatiu al DNA, no és un biomarcador prou sensible per detectar l'estrès oxidatiu dels pacients que tenen un dany renal d'origen glomerular; però mitjançant la nostra puntuació, que inclou més biomarcadors, sí que podem evidenciar aquest estrès oxidatiu.

Figura 11. PDO dels subgrups segons l'etiologia de la IR



Mitjana i desviació estàndard dels valors de PDO en els subgrups segons l'etiologia renal. Es mostren els resultats numèrics de les mitjanes de PDO.

Un cop valorat de manera general l'estrès oxidatiu en aquesta malaltia, vam estudiar els paràmetres de manera individual per veure quins eren bons biomarcadors d'estrès oxidatiu en la IR (taula IX).

En primer lloc, vam veure una alteració del sistema glutatió, tant en eritròcits com en plasma. En eritròcits vam observar un augment significatiu del GSSG i de la ràtio GSSG/GSH. A més, el GSH va mostrar una tendència a disminuir que ens va fer pensar en el malfuncionament del sistema de recanvi del GSH en l'eritròcit. En el plasma vam trobar un augment significatiu del GSH i del GSSG, en conseqüència, la ràtio GSSG/GSH no es va alterar. Per tant, els canvis en les concentracions del glutatió reduït i oxidat en l'eritròcit respecte l'eritròcit del malalt amb IR, indiquen que el sistema antioxidant està afectat i que, en conseqüència, aquests biomarcadors serien eficients per confirmar l'existència d'un estrès oxidatiu en malalts amb IR.

Ceballos-Picot i col·ls. (*Free Radic Biol Med*, 1996) van proposar el sistema antioxidant del glutatió com a biomarcador de l'estrès oxidatiu en el context de la insuficiència renal. El seu estudi va mostrar que el comportament dels biomarcadors GSH, GSSG, GR i GPx era diferent en eritròcits i plasma. En eritròcits, tant la GPx com la GR augmentaven significativament en els malalts, i, en plasma hi havia una disminució del GSH. En el nostre treball, la GPx i la GR també van augmentar a l'eritròcit, encara que només la GR ho fes d'una manera significativa. En canvi, el GSH plasmàtic va augmentar significativament, cosa que contradiu els resultats de Ceballos-Picot i col·ls.. En treballs anteriors de Mimic-Oka i col·ls., (*Biochem Med Metabol Biol*, 1988) els valors de GSH plasmàtic eren inferiors en els controls com ens passa a nosaltres. En la literatura trobem, doncs, resultats contradictoris pel que fa als nivells de glutatió plasmàtic en malalts renals. En el ronyó dels individus amb IR hi ha diferents canvis en la histopatologia, com la pèrdua de nefrones o la deficiència de seleni, que poden relacionar-se amb una alteració del GSH i del sistema enzimàtic seleni dependent, com la GPx i tots els enzims relacionats.

L'anàlisi en plasma vol ser un reflex de tot el que passa en el ronyó, però els resultats tan diversos que mostren els diferents articles ens fan pensar que el nivell plasmàtic d'aquest antioxidant no seria un biomarcador fiable de l'estrès oxidatiu en la IR.

La GST va augmentar significativament en els individus amb IR. Aquest enzim pot actuar com a detoxificador, eliminant diferents compostos electrofílics d'origen endogen o exogen conjugant-se amb el GSH i formant un tioèter eliminable per l'orina. Si el ronyó no funciona bé, hi ha una acumulació d'aquests tioèters amb un consum augmentat del GSH (probablement és per això que en l'eritròcit hi ha una tendència a disminuir-ne els valors) i la GST pot augmentar per un efecte secundari o inductor. En definitiva, sembla que en la IR, un bon biomarcador podria ser tot el sistema GSH/GST eritrocitari, però encara que el nostre estudi inclogui gran quantitat dels enzims implicats (GR, GPx i GST), manca saber perquè, davant la demanda de GSH, només es va observar un augment d'aquest en el plasma i no a l'eritròcit. Per això, en un futur, i fixant-nos en l'esquema de la figura 6, s'hauria de pensar a analitzar els enzims implicats en la síntesi del GSH.

La lipoperoxidació és un biomarcador molt utilitzat en treballs que estudien la IR, no obstant, els nostres resultats no indiquen variació en les TBARS, ni en eritròcit ni en plasma. Nourooz-Zadeh i col·ls. (*Redox Report*, 1999) van estudiar l'estrès oxidatiu en malalts sotmesos a hemodiàlisi i no sotmesos a hemodiàlisi utilitzant dos biomarcadors, un dels quals eren les TBARS. Aquests autors no van trobar diferències significatives en aquest indicador entre controls i malalts no sotmesos a hemodiàlisi, ni entre controls i pacients sotmesos a diàlisi. En canvi, un estudi de Vaziri i col·ls. (*Kidney International*, 2003) fet en rates amb IR induïda mostrava un increment significatiu de la lipoperoxidació. Banni i col·ls., van explicar, en un dels seus treballs,

que les tècniques més utilitzades per determinar la lipoperoxidació, les TBARS i els diens conjugats, eren les responsables d'aquesta contradicció. Les TBARS mesuren el malondialdehid però, quan es mesuren en fluids biològics, es poden produir artefactes que ens alterin els resultats, ja que hi ha moltes molècules que també reaccionen amb l'acid tiobarbitúric com són els sucres, aminoàcids, prostaglandines, tromboxans, fàrmacs, hemoglobina i l'urea. Els diens conjugats tampoc serien uns bons indicadors perquè, segons Banni i col·ls., també poden provenir de la dieta (*Nephron*, 1996). Per tant, les TBARS no són un bon biomarcador d'estrès oxidatiu per a aquesta malaltia.

Finalment, els malalts amb IR eren més susceptibles a l'oxidació que els controls, ja que el test d'hemòlisi va ser significativament superior en el grup malalt. És ben sabut que la IR va acompanyada d'un grau d'anèmia més o menys severa depenent del grau de la malaltia, ja que els ronyons no són capaços de sintetitzar correctament l'hormona estimuladora de la producció d'eritròcits, la eritropoetina (EPO). Per tant, no només hi ha menys eritròcits en la sang dels malalts amb IR sinó que aquests són més susceptibles a l'oxidació, probablement per una menor capacitat antioxidant en les membranes eritrocitàries.

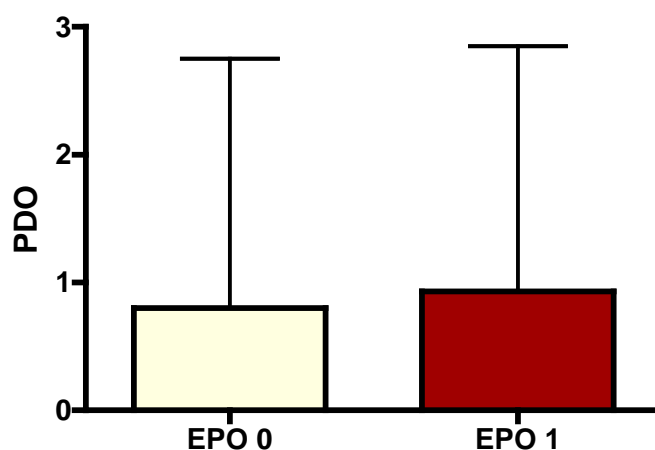
Taula IX. Biomarcadors del distrès oxidatiu en la insuficiència renal

BIOMARCADORS	CONTROL (n=63)	IR (n=63)
	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,68 ± 0,45	2,55 ± 0,89 *
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,38 ± 0,22	0,39 ± 0,34
R-GST (%)	22,33 ± 10,86	16,45 ± 14,75 *
GSH (µmol/g Hb)	5,18 ± 1,57	4,95 ± 2,26
GSSG (µmol/ g Hb)	0,80 ± 0,41	1,52 ± 0,77 *
GSSG/GSH	0,17 ± 0,11	0,42 ± 0,49 *
TBARS (nmol/g Hb)	4,96 ± 2,84	5,15 ± 5,48
SOD (U/g Hb)	1675,70 ± 474,32	1632,24 ± 694,09
CAT (mmol/min/g Hb)	225,70 ± 33,59	229,40 ± 100,84
GR (µmol/min/g Hb)	3,61 ± 1,47	4,39 ± 2,22 *
GPx (µmol/min/g Hb)	27,49 ± 7,39	29,83 ± 8,86
HE (%)	11,08 ± 4,41	14,44 ± 5,48 *
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	23,31 ± 13,36	28,84 ± 15,55 *
GSSG (nmol/ml)	25,28 ± 7,77	31,59 ± 15,55 *
GSSG/GSH	1,67 ± 1,42	1,47 ± 1,34
TBARS (nmol/ml)	2,05 ± 1,11	2,16 ± 0,82

Mitjanes, desviacions estàndard i valors de referència dels biomarcadors en el grup control sa i el grup amb insuficiència renal. La n és el nombre d'individus. * indica paràmetres significativament diferents entre CONTROL i IR ($p < 0,005$)

Alguns dels individus amb IR van iniciar un tractament amb EPO per corregir l'anèmia lligada a la IR i, tal com s'ha comentat a material i mètodes, es van tornar a analitzar els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu i es va calcular la PDO després de sis mesos de tractament. Els resultats dels biomarcadors i de la PDO es mostren a la taula X i a la figura 12 respectivament. Tot i que alguns autors atribueixen a la EPO propietats antioxidants (Grune i col·ls., *Clinical Nephrology* 2000; Herrera i col·ls., *Am J Kidney Diseases* 2001) i altres li atribueixen propietats prooxidants (Németh i col·ls., *Pediatr Nephrol*, 2001), el nostre estudi va concloure que la EPO no influeix en el desenvolupament de l'estrès oxidatiu en la malaltia renal, és a dir, la PDO ens demostra que l'estrès oxidatiu és una característica de la malaltia renal i que aquest es manté després del tractament amb EPO.

Figura 12. PDO dels malalts amb IR abans i després del tractament amb EPO



Mitjana i desviació estàndard de la PDO en el grup abans (EPO 0) i després de sis mesos de tractament (EPO 1).

A l'estudiar els biomarcadors individualment, vam veure un augment en el GSH eritrocitari i una disminució de l'enzim detoxificador SOD degudes a l'administració d'EPO. Tot i que l'augment del GSH incrementa també les possibilitats de detoxificació d'ERO i, per tant podria disminuir l'estrès oxidatiu, la disminució de l'enzim SOD fa que la cascada de detoxificació de l'anió superòxid s'aturi i, per tant podria augmentar el dany radicalar (Vaziri i col·ls., *Kidney Int*, 2003). Per aquest motiu i, almenys amb els biomarcadors estudiats en aquesta tesi, vam concloure que la EPO no té cap efecte sobre l'estrès oxidatiu. Per tant, no seria necessari administrar un fàrmac antioxidant, com la vitamina E, per pal·liar les seves conseqüències. No obstant, la introducció dels biomarcadors de dany al DNA i a les proteïnes ens podrien indicar un dany o una millora en el perfil oxidatiu dels pacients amb IR tractats amb EPO.

Taula X. Biomarcadors del distrès oxidatiu en malalts amb IR abans del tractament amb EPO (EPO 0) i després de sis mesos de tractament (EPO 1)

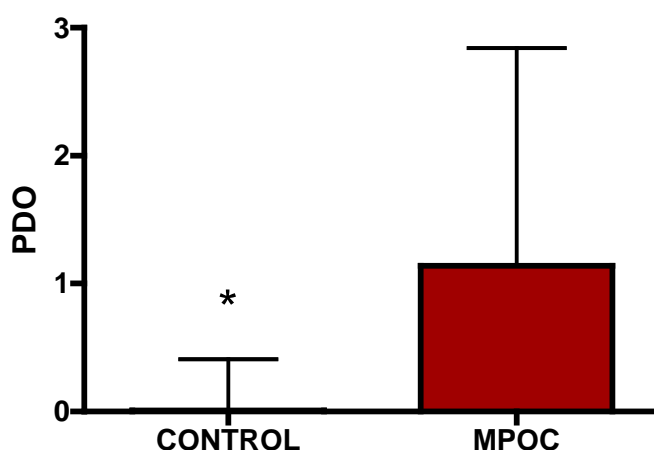
BIOMARCADORS	EPO 0 (n=44) MITJANA ± DE	EPO 1 (n=44) MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	2,52 ± 0,95	2,25 ± 0,90
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,45 ± 0,40	0,43 ± 0,32
R-GST (%)	18,00 ± 15,05	19,27 ± 12,17
GSH (µmol/g Hb)	4,95 ± 2,38	5,90 ± 2,32 *
GSSG (µmol/ g Hb)	1,48 ± 0,77	1,48 ± 0,69
GSSG/GSH	0,44 ± 0,56	0,39 ± 0,82
TBARS (nmol/g Hb)	3,82 ± 4,07	3,28 ± 2,35
SOD (U/g Hb)	1692,23 ± 734,95	1299,20 ± 365,57 *
CAT (mmol/min/g Hb)	222,43 ± 62,41	211,15 ± 51,00
GR (µmol/min/g Hb)	4,35 ± 2,48	4,74 ± 3,24
GPx (µmol/min/g Hb)	30,59 ± 8,20	34,98 ± 11,92
HE (%)	14,24 ± 4,81	15,34 ± 6,27
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	29,06 ± 15,25	31,53 ± 16,25
GSSG (nmol/ml)	30,16 ± 15,11	33,83 ± 14,63
GSSG/GSH	1,38 ± 1,18	1,46 ± 1,26
TBARS (nmol/ml)	1,97 ± 0,91	2,16 ± 1,04

Mitjanes i desviacions estàndard en el grup d'insuficiència renal abans del tractament amb EPO (EPO 0) i després de sis mesos de tractament (EPO 1). La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives entre els grups ($p < 0,005$).

3. DISTRÈS OXIDATIU EN MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

La PDO dels pacients amb MPOC va ser significativament superior que la PDO control ($1,14 \pm 1,70$ vs $0,01 \pm 0,40$) tal com es mostra a la figura 13. El grup control estava format per individus procedents del grup control inicial però aparellats en nombre, edat i sexe amb els individus amb MPOC. Com s'ha comentat anteriorment en aquesta tesi, l'MPOC està relacionada amb l'hàbit tabàquic on el fum del tabac i les substàncies prooxidants que el tabac conté fan que l'estrès oxidatiu sigui una característica d'aquesta malaltia.

Figura 13. PDO dels malalts amb MPOC i els controls sans



Mitjana i desviació típica dels valors de PDO en el grup sa i en el grup amb MPOC. * indica diferències significatives ($p < 0,005$).

Els resultats dels biomarcadors estudiats de manera individual es troben a la taula XI. Quan vam obtenir els resultats de la PDO en l'MPOC vam concloure, sense cap dubte, que la malaltia estava relacionada amb l'estrès oxidatiu. No obstant, en mesurar els biomarcadors individualment, no n'hi havia cap que es mostrés clarament com a indicador d'estrès oxidatiu.

Taula XI. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup control i el grup amb MPOC

BIOMARCADORS	CONTROL (n=14)	MPOC (n=14)
	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,55 ± 0,32	1,81 ± 0,67
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,28 ± 0,14	0,32 ± 0,22
R-GST (%)	18,01 ± 8,04	18,31 ± 11,74
GSH (µmol/g Hb)	5,11 ± 1,37	4,98 ± 2,63
GSSG (µmol/ g Hb)	0,71 ± 0,34	0,90 ± 0,42
GSSG/GSH	0,15 ± 0,11	0,38 ± 0,56
TBARS (nmol/g Hb)	4,89 ± 2,15	1,37 ± 1,12 *
SOD (U/g Hb)	1653,14 ± 399,59	1980,58 ± 1136,77
CAT (mmol/min/g Hb)	208,36 ± 38,54	228,31 ± 42,26
GR (µmol/min/g Hb)	3,44 ± 1,65	2,42 ± 0,74 *
GPx (µmol/min/g Hb)	25,46 ± 5,66	17,91 ± 6,85 *
HE (%)	11,96 ± 3,42	8,33 ± 3,25 *
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	24,58 ± 12,99	17,85 ± 18,34
GSSG (nmol/ml)	24,29 ± 9,40	24,88 ± 15,91
GSSG/GSH	1,49 ± 1,35	3,36 ± 4,51
TBARS (nmol/ml)	1,77 ± 0,99	1,37 ± 0,76

Mitjanes, desviacions estàndard i valors de referència dels biomarcadors en el grup control sa i el grup amb malaltia pulmonar obstructiva crònica. La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives entre els dos grups (p<0,005).

Alguns biomarcadors, com l'hemòlisi o les TBARS disminuïen significativament en el grup de MPOC respecte el grup control, és a dir, la susceptibilitat a ser oxidats i el dany oxidatiu a les membranes era major en individus sans que en els malalts. Aquests resultats ens van fer pensar que l'assaig de les TBARS es pot veure modificat per artefactes que provenen de la recollida de mostres, l'emmagatzematge o problemes causats simplement per la complexitat dels sistemes biològics. Segons Dotan i col·ls. (*Prog Lipid Res*, 2004) la limitació de la tècnica de les TBARS ve donada per la vida mitja tan curta dels productes assajats. En resum, ni la tècnica del test d'hemòlisi ni les TBARS van servir per a detectar un estrès oxidatiu que, segons la PDO, existia de manera important en els malalts d'MPOC.

Els únics biomarcadors alterats en els individus amb MPOC i que podrien interpretar-se com a indicadors d'estrès oxidatiu van ser la disminució significativa dels enzims GR i GPx. No obstant, alguns autors han trobat nivells alts de SOD i de CAT en sang, i sembla que tenen el paper de compensar els efectes de la depressió dels altres enzims antioxidants (Toth i col·ls., *Am Rev Respir Dis*, 1986). Molts dels estudis en els que es revisa el sistema antioxidant en malalts amb MPOC són en esput dels individus afectats. Junt amb l'epiteli bronquial, el fluid de revestiment és el primer en posar-se en contacte amb els agents oxidants; per això, en l'esput és on es veu clarament l'esgotament dels enzims antioxidants i del glutatió, que són els principals atrapadors de RLLO i ERO en aquest nivell (Young i col·ls., *CAB Internat*, 1999).

A més, en l'estudi de l'estrès oxidatiu relacionat amb l'MPOC, és interessant conèixer els nivells d'òxid nítric, que és un radical lliure i un pol·luent de l'aire, comú i abundant en el fum del tabac. Alguns metabòlits de l'òxid nítric, com el peroxinitrit, són inestables i es descomposen formant nitrits i nitrats, que són els que es quantifiquen per tenir la mesura indirecta de la quantitat d'òxid nítric present al fluid de revestiment pulmonar (Corradi, *Nitric Oxide-Biol Ch*, 2003).

Per tant, si volem estudiar quins biomarcadors es troben més afectats en l'MPOC, s'hauria de canviar el tipus de mostra, incloent-hi el fluid de revestiment pulmonar, i ampliar els paràmetres estudiats, és a dir, no només detectar el dany de les ERO sinó també determinar el dany que poden provocar les espècies reactives del nitrogen.

A pesar d'aquestes mancances, el PDO va ser significativament superior en els individus amb MPOC, la qual cosa indica que la valoració global és capaç de detectar l'estrès oxidatiu en l'MPOC, en una mostra de sang, i sense la necessitat de valorar l'efecte o els productes de les espècies reactives del nitrogen. El nostre valor de PDO s'hauria de poder correlacionar amb els biomarcadors de l'esput, per veure si pot ser una dada clínica que reflexi l'estrès oxidatiu produït en el pulmó, i així tenir una via d'estudi de més fàcil accés i menys costosa. Però, per fer-ho es necessita comptar amb major nombre de mostres i avaluar el grau d'evolució de la malaltia, el grau de tabaquisme i el tractament farmacològic rebut, entre altres factors que poden influir en el grau d'estrès oxidatiu.

4. DISTRÈS OXIDATIU EN LA SÈPSIA I L'INFART

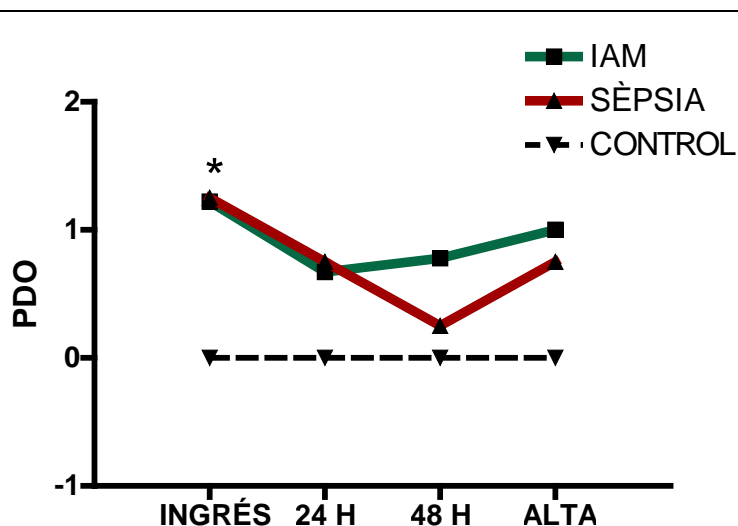
La PDO de la població amb sèpsia en el moment de l'ingrés a la Unitat de cures intensives va ser de $1,25 \pm 1,39$ punts. Aquest valor va baixar a les 24 hores fins a $0,75 \pm 0,89$ punts i a les 48 hores fins a $0,25 \pm 0,7$ punts, en el moment de l'alta va tornar a pujar fins a $0,75 \pm 0,95$ punts. D'aquest grup de malalts s'ha de dir que 4 van ser baixes per mort, i per tant no vàrem tenir l'última analítica.

En la població de malalts d'infart (IAM), els valors de la PDO en les quatre moments esmentats anteriorment van ser respectivament: $1,22 \pm 1,71$; $0,67 \pm 1,32$; $0,78 \pm 1,30$ i $1 \pm 1,41$ punts en el moment de l'alta. En aquest grup també ens manquen les analítiques de 5 pacients que van ser donats d'alta en cap de setmana i per tant no vam poder fer-los l'extracció de sang.

Aquestes dades es poden veure a la figura 14, on s'inclouen també les dades d'una població control de les mateixes característiques d'edat i sexe.

Les diferències significatives entre les dues poblacions de malalts i els controls només es va observar en el moment de l'ingrés; encara que tots els valors sempre van estar per damunt de la població control durant tota l'evolució.

Figura 14. Evolució de la PDO dels malalts amb sèpsia i IAM



Mitjanes dels valors de PDO en els grups de sèpsia i IAM en el moment d'ingrés hospitalari, a les 24 hores, a les 48 hores i en el dia de l'alta. * indica diferències significatives entre els grup IAM respecte el control i de sèpsia respecte el control ($p < 0,005$).

Per tal d'avaluar la participació del factor bacterià en l'estrès oxidatiu dins el grup de pacients amb sèpsia, vàrem utilitzar un grup de pacients amb IAM com a grup control (taula XII).

Taula XII. PDO del grup amb sèpsia i el grup IAM

	SÈPSIA	IAM
	MITJANA ± DE (n)	MITJANA ± DE (n)
INGRÉS	1,25 ± 1,39 (9)	1,22 ± 1,72 (8)
24 hores	0,75 ± 0,89 (9)	0,67 ± 1,32 (8)
48 hores	0,25 ± 0,71 (9)	0,78 ± 1,30 (8)
ALTA	0,75 ± 0,96 (4)	1,00 ± 1,41 (4)

Mitjanes i desviacions estàndard del pacients amb sèpsia i infart en les quatre determinacions realitzades: dia d'ingrés, a les 24 hores de l'ingrés, a les 48 hores de l'ingrés i el dia de l'alta.

Poques conclusions podem treure d'aquests resultats amb les dades disponibles fins el moment, ja que el nombre de casos és molt baix i existeix gran variabilitat en la puntuació. Per exemple, en l'IAM, en el moment de l'ingrés la desviació estàndard és superior a la mitjana. Sembla que s'observa major estrès oxidatiu en la sèpsia que en l'infart, però, per treure conclusions s'haurien d'incloure més individus i poder-ho relacionar amb altres marcadors clínics com els indicadors d'inflamació (SIRS), els indicadors de gravetat (APACHE II) i de disfunció orgànica (SOFA). Això ens permetria establir factors pronòstics o de tractament útils en la pràctica clínica.

En l'infart agut, les defenses antioxidants de les cèl·lules del miocardi poden saturar-se, ja que augmenta l'estrès oxidatiu i, com a conseqüència, es pot perdre la homeostasi intracel·lular, s'altera la senyalització cel·lular i s'indueix el procés patològic (Hensley i col·ls., *Antioxid Redox Signa*, 2000; Martindale i col·ls., *J Cell Physiol*, 2002; Ueda i col·ls., *Free Radic Biol Med*, 2002).

Altres autors observen una disminució de la disponibilitat de seleni correlacionada positivament amb la severitat de la malaltia (Rivera i col·ls., *Am J Trop Med Hyg*, 2002), cosa que fa pensar que les defenses antioxidants estan molt relacionades amb la progressió de l'IAM. Potser per aquest motiu la PDO es manté a les 48 hores i a l'alta com a conseqüència de la producció de RLLO post-isquèmia.

La sèpsia és una de les principals causes de mort en les UCI. Es tracta d'una resposta inflamatòria a nivell sistèmic causada per l'excés de mediadors proinflamatoris, com les ERO o el factor de necrosi tumoral. La sèpsia inclou una infecció generalitzada del torrent circulatori d'origen bacterià. Quan aquesta infecció fa que el flux sanguini baixi, i alguns òrgans com el cervell, el cor, els ronyons o el fetge deixen de funcionar correctament, parlem de xoc sèptic.

Tant la sèpsia com l'IAM tenen alterada la balança prooxidant-antioxidant i els seus mecanismes antioxidants es veuen compromesos. Igualment, totes dues malalties estan relacionades amb la isquèmia, o falta de rec sanguini, però l'IAM no és d'origen bacterià. En la sèpsia, la producció de mediadors inflamatoris donen lloc a la producció excessiva d'ERO i també d'òxid nítric. La combinació d'ambdós tipus de molècules comporta un estat oxidatiu molt més potent que en l'IAM (Motoyama i col·ls., *Crit Care Med* 2003).

Els resultats dels biomarcadors estudiats tant en IAM com en sèpsia es troben a les taules XIII i XIV respectivament.

Taula XIII. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup amb IAM i el grup control

BIOMARCADORS	CONTROL (n=9)	IAM 0 (n=9)	IAM 1 (n=9)	IAM 2 (n=9)	IAM 3 (n=4)
	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>					
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,70± 0,31	1,92± 0,52	1,80± 0,57	1,56± 0,53	1,56± 0,22
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,36± 0,20	0,14± 0,06 *	0,13± 0,05 *	0,14± 0,09 *	0,10± 0,04 *
R-GST (%)	19,92± 8,04	7,39± 2,38 *	7,21± 2,35 *	9,42± 8,14 *	6,56± 1,75 *
GSH (µmol/g Hb)	4,97± 2,04	3,86± 0,84	4,20± 1,22	4,14± 0,90	4,37± 1,30
GSSG (µmol/ g Hb)	0,79± 0,29	1,00± 0,50	1,03± 0,40	0,95± 0,43	0,99± 0,26
GSSG/GSH	0,19± 0,11	0,27± 0,15	0,26± 0,12	0,24± 0,12	0,25± 0,13
TBARS (nmol/g Hb)	3,76± 2,20	1,21± 0,61 *	1,49± 0,50 *	1,60± 0,56 *	1,22± 0,53 *
SOD (U/g Hb)	1544± 301	2661± 839 *	2434± 648 *	2381± 451 *	2051± 404 *
CAT (mmol/min/g Hb)	209± 16,62	211± 48,88	211± 49,99	213± 33,74	257± 39,33 *
GR (µmol/min/g Hb)	3,13± 0,77	3,42± 0,90	3,28± 0,67	2,82± 0,73	3,05± 1,10
GPx (µmol/min/g Hb)	30,09± 5,21	21,8± 9,70 *	21,9± 8,53 *	20,3± 9,25 *	21,7± 7,26 *
HE (%)	10,81± 4,13	8,01± 5,27	9,87± 5,80	7,71± 5,71	7,76± 4,30
<i>Plasma</i>					
GSH (nmol/ml)	20,32± 13,62	28,0± 12,81	24,7± 12,14	25,5± 11,58	34,8± 20,09
GSSG (nmol/ml)	27,00± 6,67	21,3± 12,90	21,2± 10,76	19,4± 6,89 *	19,5± 2,91
GSSG/GSH	2,21± 1,62	1,03± 1,12	1,56± 2,37	0,91± 0,45 *	0,83± 0,65
TBARS (nmol/ml)	1,56± 0,80	1,06± 0,45	1,09± 0,35	1,10± 0,47	1,03± 0,29

Mitjanes, desviacions estàndard i valors de referència dels biomarcadors en el grup control sa i el grup amb infart agut de miocardi a l'ingrés a la UCI (IAM 0), 24 i 48 hores més tard (IAM 1 i 2) i el dia de l'alta de la UCI (IAM 3). La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives amb el control ($p<0,005$).

En aquestes taules hem inclòs els valors del moment de l'alta d'aquells individus que continuaven a l'estudi o vàrem obtenir dades, però són grups amb molt pocs individus, com hem comentat per a la PDO.

En l'estudi dels biomarcadors de l'estrès oxidatiu de l'IAM i la sèpsia, vam observar que la GST termostable i la residual disminuïen significativament en el moment de l'ingrés respecte als controls, encara que la GST total no variés. Això significa que la GST és més feble en els malalts que en els controls i que pot disminuir la seva funcionalitat com a molècula detoxificadora.

La GST es veu afectada en les dues malalties, per tant, no es pot proposar aquest enzim com a marcador de l'estrès oxidatiu que s'indueix en la sèpsia a conseqüència de la presència de l'endotoxina bacteriana.

En els individus amb IAM, la SOD va augmentar i la GPx va disminuir significativament respecte el control sa en totes les fases de la malaltia. Aquestes variacions poden induir un estrès oxidatiu ja que, si la SOD funciona en excés, es produeixen moltes molècules de peròxid d'hidrogen, que no poden ser eliminades a causa de la disminució de GPx, i es produeix la formació de radicals hidroxils. En la sèpsia, la GPx també disminueix significativament i la CAT augmenta a les 48 hores.

Taula XIV. Biomarcadors del distrès oxidatiu en el grup amb sèpsia i el grup control

BIOMARCADORS	CONTROL (n=9)	SÈPSIA 0 (n=8)	SÈPSIA 1 (n=8)	SÈPSIA 2 (n=8)	SÈPSIA 3 (n=4)
	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>					
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,70± 0,31	1,63± 0,36	1,54± 0,31	1,68± 0,46	1,64± 0,33
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,36± 0,20	0,11± 0,04 *	0,10± 0,02 *	0,12± 0,04 *	0,15± 0,05 *
R-GST (%)	19,92± 8,04	6,50± 1,85 *	6,90± 1,84 *	7,39± 2,79 *	9,71± 4,61 *
GSH (µmol/g Hb)	4,97± 2,04	3,35± 0,49 *	3,39± 0,35	3,78± 0,63	3,78± 1,09
GSSG (µmol/ g Hb)	0,79± 0,29	1,11± 0,35	0,97± 0,23	0,94± 0,42	0,88± 0,28
GSSG/GSH	0,19± 0,11	0,34± 0,11 *	0,29± 0,07	0,26± 0,12	0,26± 0,14
TBARS (nmol/g Hb)	3,76± 2,20	1,26± 0,29 *	1,21± 0,37 *	1,37± 0,64 *	1,10± 0,46 *
SOD (U/g Hb)	1544± 301	1999± 676	2065± 664	1918± 500	2191± 672
CAT (mmol/min/g Hb)	209± 16,62	193± 30,16	197± 43,78	229± 20,06 *	194± 45,76
GR (µmol/min/g Hb)	3,13± 0,77	3,20± 0,88	3,17± 0,85	3,54± 0,73	3,07± 1,35
GPx (µmol/min/g Hb)	30,09± 5,21	25,0± 9,00	24,1± 8,32	20,3± 10,05 *	25,5± 5,97
HE (%)	10,81± 4,13	6,33± 2,00 *	6,88± 1,51 *	7,22± 1,83 *	3,79± 0,52 *
<i>Plasma</i>					
GSH (nmol/ml)	20,32± 13,62	20,2± 5,45	19,8± 5,21	18,6± 4,22	23,8± 11,03
GSSG (nmol/ml)	27,00± 6,67	15,0± 7,77 *	15,7± 6,04 *	16,1± 6,44 *	13,0± 1,48 *
GSSG/GSH	2,21± 1,62	0,80± 0,49 *	0,87± 0,49 *	0,92± 0,46 *	0,64± 0,28
TBARS (nmol/ml)	1,56± 0,80	1,59± 0,87	1,59± 0,63	1,70± 0,83	1,56± 0,42

Mitjanes i desviacions estàndard dels biomarcadors en el grup control sa i el grup sèpsia a l'ingrés a la UCI (SÈPSIA 0), 24 i 48 hores més tard (SÈPSIA 1 i 2) i el dia de l'alta de la UCI (SÈPSIA 3). La n és el nombre d'individus. *indica diferències significatives amb el grup control ($p < 0,005$).

Tant en una malaltia com en l'altra, les TBARS eritrocitàries disminueixen de manera significativa respecte els controls sans en totes les fases, des de l'ingrés a l'alta. Com que es tracta de malalties greus i molt relacionades amb els radicals lliures, resulta paradoxal que el nivell de lipoperoxidació sigui més baix.

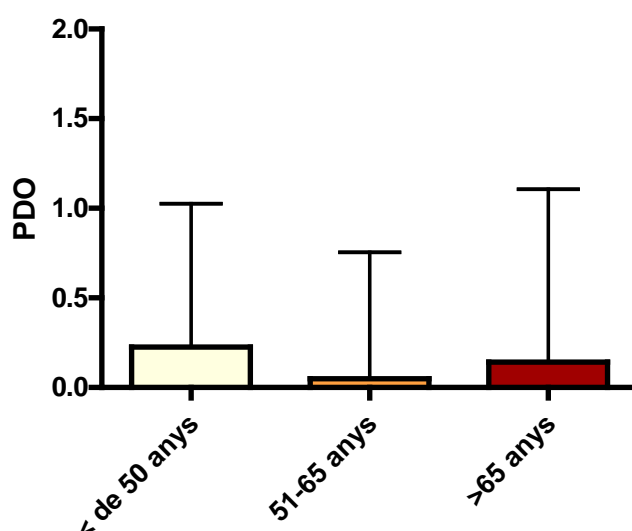
De la mateixa manera, no vam poder explicar el motiu pel qual les cèl·lules eritrocitàries dels individus amb sèpsia presenten menys susceptibilitat d'oxidació que els controls sans. Finalment, vam trobar també nivell baixos de GSSG i GSSG/GSH en el plasma, la qual cosa semblaria indicar que els individus amb sèpsia no tenen dany oxidatiu en el sistema del glutatió.

Els resultats, doncs, no deixen de ser sorprenents. Per tant, de moment, no es pot recomanar la utilització de la PDO per valorar el grau d'estrès oxidatiu en la sèpsia, ni la utilització, de manera aïllada, de qualsevol dels biomarcadors estudiats en aquest treball fins que no hi hagi un major nombre d'individus a l'estudi. En aquest sentit, Dalle-Donne i col·ls. van demostrar en el seu treball que la sèpsia està relacionada amb un dany proteic important d'origen radicalar (*Clin Chim Acta*, 2003). Per tant, la valoració del dany a proteïnes mitjançant la quantificació de proteïnes carbonilades ens podria ser útil com a biomarcador en aquesta patologia.

5. DISTRÈS OXIDATIU EN ENVELLIMENT

El distrès oxidatiu depenent de l'edat s'ha estudiat en aquest treball mitjançant l'aplicació de la PDO a tres grups amb diferents edats. Els resultats van ser els següents: el grup d'individus de menys de 50 anys van obtenir una puntuació de $0,23 \pm 0,80$ punts, els individus d'edat compresa entre 51 i 65 anys van obtenir una puntuació de $0,05 \pm 0,70$ punts i la PDO del tercer grup, de més de 65 anys, va ser $0,14 \pm 0,96$ punts. No es van trobar diferències significatives entre els tres rangs d'edat; a més, tots els valors eren molt pròxims a 0 punts, és a dir, els individus estudiats es trobaven en una situació d'equilibri en la balança prooxidant-antioxidant (Figura 15).

Figura 15. PDO dels controls sans agrupats segons l'edat



Mitjanes i desviacions estàndard dels valors de PDO en els grups de menys de 50 anys, entre 51 i 65 anys i més de 65 anys.

Segons la teoria dels radicals lliures, l'envelliment és causat per l'acció oxidant de les ERO. No obstant, sembla que les ERO estan més relacionades amb les malalties que acompanyen a l'envelliment que amb l'envelliment en si. Les mostres obtingudes dels individus de més de 65 anys provenien d'estudiants de la "Universitat de la Gent Gran", tal com s'ha comentat a l'apartat de material i mètodes. En tots els rangs d'edat, inclòs els de més de 65 anys, només hem considerat del grup control aquells individus que declaraven no patir cap patologia ni prendre cap fàrmac. A més, la majoria de les persones grans que participaven com a controls declaraven tenir hàbits diaris saludables en relació a la dieta i l'exercici físic. Per tant, és probable que la nostra mostra control de persones de més de 65 anys no sigui prou representativa de la població normal d'aquesta edat. L'absència de malaltia o de fàrmacs prooxidants i els bons hàbits nutricionals podrien explicar la baixa PDO obtinguda en el tercer rang d'edat.

També es van estudiar els diferents biomarcadors de manera individual en cada rang d'edat, i per comparar els diferents rangs d'edat es va realitzar una ANOVA i les proves *post hoc* Scheffé corresponents per a fer l'estudi de comparacions múltiples. Els resultats obtinguts es presenten a la taula XV.

Taula XV. Biomarcadors del distrès oxidatiu en diferents rang d'edat

BIOMARCADORS	EDAT 1 (n=53) MITJANA ± DE	EDAT 2 (n=41) MITJANA ± DE	EDAT 3 (n=21) MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>			
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,55 ± 0,43	1,59 ± 0,45	1,74 ± 0,50
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,31 ± 0,19	0,34 ± 0,23	0,41 ± 0,22
R-GST (%)	20,08 ± 10,67	20,91 ± 11,45	24,48 ± 10,84
GSH (µmol/g Hb)	5,19 ± 1,29	5,64 ± 1,74	4,35 ± 0,80 †
GSSG (µmol/ g Hb)	0,86 ± 0,48	0,77 ± 0,37	0,91 ± 0,43
GSSG/GSH	0,17 ± 0,10	0,15 ± 0,09	0,22 ± 0,12 †
TBARS (nmol/g Hb)	4,62 ± 2,85	5,32 ± 2,84	4,68 ± 2,96
SOD (U/g Hb)	1682,70 ± 504,16	1634,67 ± 523,02	1824,84 ± 502,83
CAT (mmol/min/g Hb)	222,62 ± 36,76	233,19 ± 35,27	220,80 ± 37,65
GR (µmol/min/g Hb)	3,08 ± 1,26	3,40 ± 1,27	4,17 ± 1,56 ‡
GPx (µmol/min/g Hb)	27,08 ± 8,01	27,80 ± 7,94	28,19 ± 8,84
HE (%)	12,02 ± 4,59	11,68 ± 4,14	9,99 ± 5,20
<i>Plasma</i>			
GSH (nmol/ml)	26,15 ± 10,55	28,29 ± 13,99	15,03 ± 7,87 † ‡
GSSG (nmol/ml)	24,49 ± 8,68	24,30 ± 7,02	27,76 ± 7,09
GSSG/GSH	1,22 ± 0,87	1,21 ± 0,97	2,55 ± 1,74 † ‡
TBARS (nmol/ml)	1,62 ± 1,00	1,97 ± 1,09	2,37 ± 1,32 ‡

Mitjanes i desviacions estàndard dels biomarcadors en el grup control sa de menys de 50 anys (EDAT 1), d'entre 50 i 65 anys (EDAT 2) i de més de 65 anys (EDAT 3). La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives entre EDAT 1 i 2, † indica diferències significatives entre EDAT 2 i 3, ‡ indica diferències significatives entre EDAT 1 i 3 ($p < 0,005$).

Les persones del grup d'edat més alta tenen una quantitat menor de GSH tan en eritròcits com en plasma, i la ràtio GSSG/GSH està augmentada respecte al altres dos grups, per tant, la defensa enfront de les ERO és també menor. És per aquest fet que s'indueix la GR (és més alta en el grup del més grans), en canvi no s'augmenten els enzims que afavoreixen la oxidació del GSH, com ara la GPx o la GST. Hi ha estudis on s'observa un augment d'aquests enzims (De la Asunción, *FASEB J*, 1996; Hazelton, *Biochem J*, 1980). Finalment, en el plasma, les TBARS augmentaven

significativament en la gent gran respecte el rang d'edat intermig, per tant, el dany causat per la lipoperoxidació de les membranes també és superior en individus de més de 65 anys; aquest és el biomarcador més utilitzat per altres autors quan s'estudia la relació entre el distrès oxidatiu i l'edat (Junqueira i col·ls., *Mol Aspects Med*, 2004; Kasapoglu i Ózben, *Exp Gerontol*, 2001). No obstant, en estudis amb individus centenaris s'ha observat una reducció en la susceptibilitat d'oxidació de les membranes dels eritròcits, no es coneixen quins són els mecanismes de protecció, per tant, els autors d'aquest article proposen fer un estudi de paràmetres genètics i ambientals que puguin tenir una influència en aquesta protecció (Rabini i col·ls., *Exp Gerontol*, 2002). Aquest fet recolza encara més la necessitat de tenir mostres representatives de la realitat de la població en general.

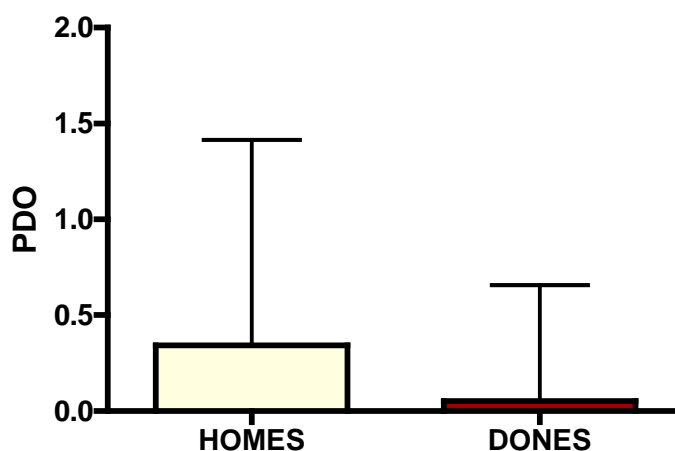
En resum, els paràmetres més afectats per l'edat han estat el GSH, la ràtio GSSG/GSH i les TBARS, encara que cap dels valors obtinguts en la gent gran, de més de 65 anys, ha sobrepassat els límits superior i inferior dels rangs de normalitat.

En la població mundial, un percentatge molt important de la gent de més de 65 anys té malalties associades a l'envelliment. La mostra utilitzada en aquesta tesi s'hauria d'ampliar, en un futur, amb individus que representessin, d'una manera més real, aquesta franja d'edat. A més, l'envelliment compromet tots els òrgans i produeix alteracions a tots els nivells, per tant, es fa difícil proposar un sol biomarcador, encara que sigui multifactorial, com la PDO, per determinar de forma sensible el pes de l'edat en el dany oxidatiu.

6. DISTRÈS OXIDATIU EN EL GÈNERE

La PDO de les dones sanes va ser de $0,05 \pm 0,60$ punts mentre que la PDO dels homes sans va ser de $0,34 \pm 1,07$ punts (figura 16). Per tant, les dones del grup control tenien menys estrès oxidatiu que els homes en les mateixes condicions, encara que les diferències no eren significatives.

Figura 16. PDO dels controls sans agrupats segons el sexe



Mitjanes i desviacions estàndard dels valors de PDO en els grups de dones i homes.

Per saber quin era el pes del sexe en la PDO es va fer un estudi de regressió lineal múltiple, l'equació resultant es descriu a continuació:

$$PDO = 0,342 - 0,290 x$$

En aquesta equació la **X** és igual a 1 en dones i a 0 en homes, és a dir, el fet de ser dona disminueix en 0,290 els punts del distrès oxidatiu.

Com hem vist en l'apartat anterior, l'edat és també un factor a tenir en compte a l'hora de valorar l'estrès oxidatiu. Per tant, l'estudi de regressió lineal múltiple es va repetir introduint les variables sexe i edat. El resultat va ser el següent:

$$PDO = 0,424 - 0,280 x - 0,002 y$$

En aquesta equació, igual que en l'anterior, la **X** és igual a 1 en dones i a 0 en homes, és a dir, el fet de ser dona disminueix en 0,280 els punts del distrès oxidatiu. La **y** de la equació representa l'edat de l'individu, és a dir, segons aquest model, per cada any de vida la PDO disminueix en 0,002 punts, no obstant aquest valor és gairebé descartable.

En síntesi, en la nostra mostra d'individus control, els homes tenien un augment de la puntuació del 67 % respecte les dones, i cada any de vida disminueix un 0,5 % la PDO. Segons això, el sexe influeix notablement en la PDO però l'edat no influeix pràcticament en el nivell d'estrès oxidatiu, no obstant, l'efecte de l'edat sobre aquest i els altres biomarcadors estudiats ja s'ha comentat en l'anterior apartat.

Els biomarcadors següents es trobaven disminuïts en el grup masculí respecte al de les dones: en eritròcits la TS-GST, el % de R-GST, la SOD, la GR i les TBARS; en plasma cap dels biomarcadors estudiats va variar amb el sexe.

A la taula XVI es descriuen aquestes variacions i també tots els altres biomarcadors estudiats i agrupats en homes i dones.

Els resultats de la GST termoestable i del % de GST residual ens van indicar una major protecció de les dones a l'atac de substàncies tòxiques, ja que l'activitat de la GST és major en aquest grup.

En els homes, els nivells de l'enzim SOD eren significativament més baixos, i el fet que la GST tingués una menor activitat que en les dones, ens indica que, probablement, la disminució de SOD correspon a un esgotament de la molècula per culpa d'un excés de les ERO. A més, la GR també es trobava en nivells significativament inferiors en homes, que perdien així certa capacitat detoxificadora.

No obstant, tant en el grup que estudia el gènere com en el de l'edat, els nivells de tots els biomarcadors estudiats es troben dins els rangs de normalitat i no podem parlar, en cap cas, d'un estrès oxidatiu sinó d'una predisposició més o menys alta a patir un dany de tipus oxidatiu en el cas d'un atac de les ERO.

Taula XVI. Biomarcadors del distrès oxidatiu en els dos sexes

	DONES (n=77)	HOMES (n=38)
BIOMARCADORS	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
EDAT (anys)	52,7 ± 15,4	46,9 ± 15,1
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,61 ± 0,43	1,56 ± 0,49
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,38 ± 0,23	0,25 ± 0,13 *
R-GST (%)	23,39 ± 11,51	16,69 ± 8,38 *
GSH (µmol/g Hb)	5,04 ± 1,36	5,52 ± 1,62
GSSG (µmol/ g Hb)	0,79 ± 0,39	0,94 ± 0,50
GSSG/GSH	0,17 ± 0,09	0,19 ± 0,12
TBARS (nmol/g Hb)	5,16 ± 2,98	4,31 ± 2,53 *
SOD (U/g Hb)	1767,61 ± 535,91	1537,37 ± 420,73 *
CAT (mmol/min/g Hb)	228,48 ± 34,15	221,14 ± 40,82
GR (µmol/min/g Hb)	3,60 ± 1,43	2,98 ± 1,15 *
GPx (µmol/min/g Hb)	27,58 ± 8,22	27,44 ± 7,89
HE (%)	11,13 ± 4,52	12,33 ± 4,64
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	24,39 ± 13,25	25,88 ± 10,45
GSSG (nmol/ml)	24,82 ± 7,06	25,42 ± 9,44
GSSG/GSH	1,51 ± 1,26	1,36 ± 1,13
TBARS (nmol/ml)	2,09 ± 1,16	1,47 ± 0,93

Mitjanes i desviacions estàndard en el grup control d'homes i dones. La n és el nombre d'individus.
 * indica diferències significatives entre els dos grups. També es mostra l'edat dels individus.

Finalment, la disminució de les TBARS en homes respecte les dones ens va mostrar que la lipoperoxidació és més acusada en les dones. Aquest resultat s'interpreta de manera contrària a les interpretacions dels altres biomarcadors, ja que, si només estudiéssim les TBARS, arribaríem a la conclusió que les dones tenen més tendència a l'oxidació que els homes.

L'edat mitjana de les dones estudiades indica que la majoria són dones en edat menopàusica, per tant, l'augment de la lipoperoxidació pot ser causada per la disminució d'estrògens i progesterona en aquestes dones, ja que ambdues hormones tenien un rol protector.

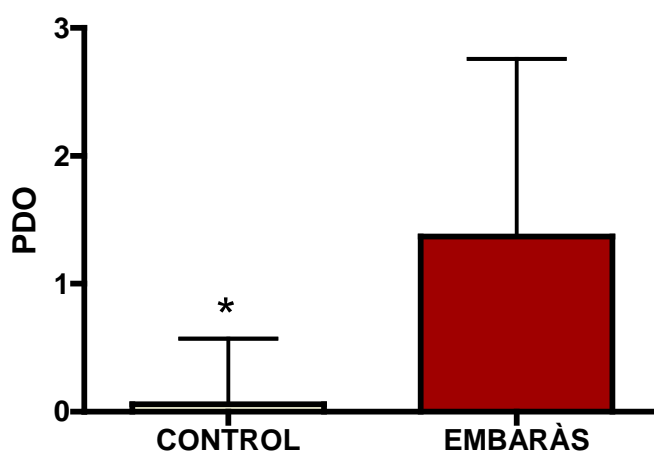
En la literatura també trobem resultats contradictoris quan els autors estudien la lipoperoxidació en homes i dones. Fano i col·ls. (*J Muscle Res Cell Motil*, 2001) van estudiar l'MDA, que també és un biomarcador de lipoperoxidació i van veure que, en el múscul esquelètic els homes grans tenien més dany oxidatiu que les dones, però els individus joves tenien molta menys quantitat de MDA i, a més, no variava segons el sexe. Aquests autors també van usar altres biomarcadors com la 8-OHdG, marcador de dany al DNA, i les proteïnes carbonilades, com a biomarcador de dany a proteïnes. En tots els casos el dany era major en persones grans que en joves, i major en homes que en dones. Mendoza-Núñez i col·ls. també van trobar els mateixos resultats però realitzats en sèrum i amb biomarcadors de dany al DNA i capacitat antioxidant. El dany al DNA era major en homes que en dones i aquestes tenien més capacitat antioxidant. En canvi, Marra i col·ls. no troben diferències entre sexes ni en els diens conjugats, que valoren la lipoperoxidació, ni en el TRAP, que valora la capacitat antioxidant, ni en el FOX, que valora el contingut de ROOH en plasma (*Diabetes Care*, 2002). En un altre publicació, es va trobar que les dones tenien menys MDA i menys TBARS abans i després de l'administració d'un antioxidant. Tot i això, els resultats només van ser significatius per l'MDA i abans del tractament (Actis-Goretta, *Clin Chim Acta*, 2004). Finalment, un estudi en rates demostrava que la CAT i la GPx augmenten notablement en els mascles, i que les TBARS baixen (Sverko i col·ls., *Biogerontol*, 2004).

Tots aquests resultats ens fan pensar que no hi ha un bon biomarcador individual que determini l'estat de la balança prooxidant-antioxidant segons el sexe, sinó que cal valorar globalment i mitjançant la PDO el nivell de distrès oxidatiu.

7. DISTRÈS OXIDATIU EN L'EMBARÀS

Les dones embarassades tenien una PDO significativament més elevada que les dones de la mateixa edat no embarassades ($1,41 \pm 1,37$ vs. $0,06 \pm 0,51$) (figura 17) a les 26 setmanes d'embaràs. El consum d'oxigen durant l'embaràs és major, per tant, també augmenta la formació d'ERO i el risc de tenir un grau d'estrès oxidatiu superior.

Figura 17. PDO de dones embarassades i no embarassades



Mitjanes i desviacions estàndard dels valors de PDO en els grups de dones embarassades (EMBARÀS) i dones no embarassades (CONTROL). * indica diferències significatives entre els grups ($p < 0,005$).

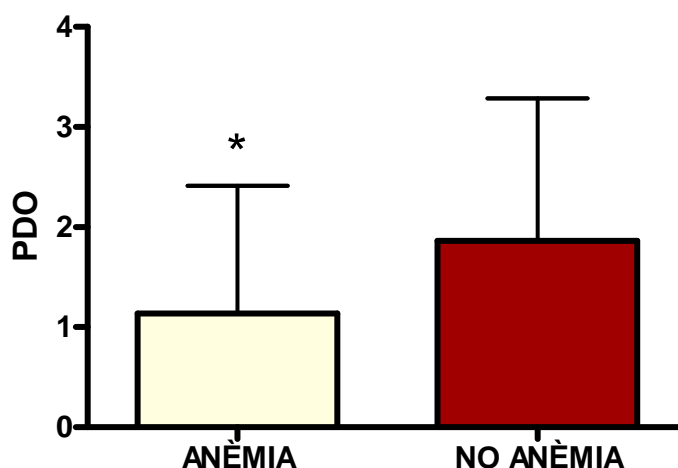
Les dones embarassades tenen major risc de patir anèmia que les no embarassades ja que el requeriment de ferro durant l'embaràs augmenta notablement.

Per això, s'administra ferro per pal·liar els efectes d'aquesta mancança. No obstant, l'administració de ferro durant l'embaràs també ha estat objecte d'estudi pels efectes adversos en la mare i en l'infant (Scholl, *Am J Clin Nutr*, 2005), com per exemple intolerància gastrointestinal o, en mares diabètiques, les malformacions en el nadó (Mukhopadhyay i col·ls., *J Obstet Gynaecol Res*, 2004). Aquests problemes, també han estat relacionats amb l'augment de producció de les ERO i el consegüent estrès oxidatiu.

Tal com s'ha dit a l'apartat de material i mètodes d'aquesta tesi, a les dones embarassades es va administrar un suplement de ferro a partir de la setmana 15 de gestació i durant tot l'embaràs, amb la finalitat d'evitar l'anèmia. A la setmana 10 de gestació, es va determinar el nivell d'hemoglobina i no hi havia cap dona d'aquest grup amb diagnòstic d'anèmia. A la setmana 26, un 62 % de les embarassades eren anèmiques (37 dones amb anèmia i 22 dones sense anèmia). En aquesta mateixa setmana també es va determinar la PDO.

Si dividim la població de dones embarassades segons si tenien anèmia o no, els resultats de la PDO van ser els següents: $1,14 \pm 1,27$ punts per a les anèmiques i $1,86 \pm 1,42$ punts per a les no anèmiques (figura 18).

Figura 18. PDO de dones embarassades amb i sense anèmia



Mitjanes i desviacions estàndard dels valors de PDO en els grups de dones embarassades amb valors d'hemoglobina < 11 g/dl (ANÈMIA) i dones embarassades amb valors d'hemoglobina > 11 g/dl (NO ANÈMIA). * indica diferències significatives entre els grups ($p < 0,005$).

Això es pot explicar dient que l'administració de ferro en les dones no anèmiques va donar, probablement, una sobrecàrrega d'aquest metall i un augment de la producció de radical hidroxil mitjançant la reacció de Fenton. En canvi, les dones anèmiques no tenien una sobrecàrrega tan gran i, per tant, mostraven un nivell més baix d'estrès oxidatiu.

Com hem comentat en l'apartat de material i mètodes, la dosi mitjana de ferro administrat era de 70 mg al dia, tant si les dones tenien anèmia com si no en tenien. Per tant, la sobrecàrrega de ferro no era conseqüència de la dosis administrada, sinó que podria ser deguda a un factor genètic, com descriu Berez i col·ls. (*Clin Chim Acta*, 2005).

En aquest treball es diu que un 46% de la població espanyola de l'àrea del Mediterrani absorbeix més quantitat de ferro, per tant, l'administració de ferro en aquesta població podria comportar efectes col·laterals al tractament, arran d'una sobrecàrrega.

En un futur, caldria estudiar la possible correlació entre la PDO i les mutacions genètiques que predisposen a la sobrecàrrega de ferro per veure si aquest major grau d'absorció va lligat a un major grau d'estrès oxidatiu induït pel ferro. Si la PDO fos un bon biomarcador d'estrès oxidatiu per a l'embaràs, conèixer el seu grau i saber els nivells d'absorció de ferro podrien facilitar el tractament preventiu de l'anèmia, i decidir, fins i tot, si fóra necessari administrar el ferro junt amb algun antioxidant que hagi demostrat disminuir els seus efectes adversos, com ara la SOD (Reece i col·ls., *J Soc Gynecol Invest*, 1998).

Els resultats de la bateria de biomarcadors relacionats amb el distrès oxidatiu es mostren a la taula XVII; i a la taula XVIII dividint la població de dones embarassades en dos grups, depenent de si tenen o no tenen anèmia.

La fracció termoestable de la GST i el % de GST residual van disminuir significativament en les dones embarassades respecte les no embarassades del mateix rang d'edat. A la taula XVIII podem veure que els valors de la GST termoestable i el % de la residual són més baixos significativament en la població amb anèmia. Per tant, l'esgotament d'aquest enzim pot fer que no es detoxifiquin algunes substàncies que poden desencadenar una cascada de reaccions i produir, finalment, un dany oxidatiu, independentment de la presa de ferro.

Taula XVII. Biomarcadors del distrès oxidatiu en dones embarassades i no embarassades

	CONTROL (n=31)	EMBARÀS (n=59)
BIOMARCADORS	MITJANA ± DE	MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,48 ± 0,42	1,39 ± 0,40
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,35 ± 0,22	0,18 ± 0,12 *
R-GST (%)	23,17 ± 11,84	13,40 ± 10,38 *
GSH (µmol/g Hb)	4,98 ± 1,27	3,28 ± 1,31 *
GSSG (µmol/ g Hb)	0,70 ± 0,33	1,10 ± 0,69 *
GSSG/GSH	0,15 ± 0,08	0,48 ± 0,56 *
TBARS (nmol/g Hb)	5,76 ± 3,37	1,14 ± 0,42 *
SOD (U/g Hb)	1787,68 ± 592,20	1746,35 ± 593,80
CAT (mmol/min/g Hb)	222,65 ± 33,93	218,85 ± 38,99
GR (µmol/min/g Hb)	3,26 ± 1,34	3,05 ± 1,18
GPx (µmol/min/g Hb)	26,22 ± 7,57	29,99 ± 8,74
HE (%)	11,66 ± 4,47	7,19 ± 2,68 *
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	25,70 ± 11,50	22,19 ± 12,94
GSSG (nmol/ml)	23,51 ± 6,19	20,41 ± 7,01
GSSG/GSH	1,21 ± 0,85	1,67 ± 1,83
TBARS (nmol/ml)	2,00 ± 1,08	1,01 ± 0,36

Mitjanes i desviacions estàndard dels biomarcadors en el grup de dones control sanes (CONTROL) i el grup d'embarassades (EMBARÀS). La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives entre els dos grups ($p < 0,05$).

En l'eritròcit, el GSH va disminuir, i el GSSG i la ràtio GSSG/GSH van augmentar significativament. Quan vàrem comprovar què passava amb els subgrups segons l'anèmia, vam observar que la població sense anèmia tenia el GSH més baix i el quocient GSSG/GSH més alt significativament.

Els resultats, doncs, van mostrar un desequilibri important en el sistema del glutatió eritrocitari en les dones embarassades, que es feia més evident en la població amb un major grau d'estrès oxidatiu, és a dir, el subgrup sense anèmia. A més, les embarassades sense anèmia són les que, probablement, tenen sobrecàrrega de ferro.

La GPx va augmentar significativament en la població de dones embarassades respecte el control. Aquest fet, juntament amb les variacions dels tres biomarcadors anteriors, van indicar la presència d'un estrès oxidatiu: un GSH disminuït indica que l'individu no pot eliminar partícules tòxiques eficientment i el GSSG i la ràtio GSSG/GSH augmentats ens mostren que el recanvi entre GSH i GSSG no funciona correctament i que hi ha una producció més alta de GSSG, ja que la GPx augmenta la seva funció.

Taula XVIII. Biomarcadors del distrès oxidatiu en dones embarassades amb i sense anèmia

BIOMARCADORS	ANÈMIA (n=37)	NO ANÈMIA (n=22)
	MITJA NA ± DE	MITJA NA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,44 ± 0,38	1,29 ± 0,43
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,14 ± 0,05	0,24 ± 0,17 *
R-GST (%)	9,93 ± 3,57	19,23 ± 14,79 *
GSH (µmol/g Hb)	3,68 ± 1,25	2,62 ± 1,19 *
GSSG (µmol/ g Hb)	1,06 ± 0,72	1,16 ± 0,64
GSSG/GSH	0,41 ± 0,56	0,60 ± 0,55 *
TBARS (nmol/g Hb)	1,16 ± 0,47	1,11 ± 0,34
SOD (U/g Hb)	1799,75 ± 618,61	1656,55 ± 551,68
CAT (mmol/min/g Hb)	222,75 ± 40,49	212,30 ± 36,29
GR (µmol/min/g Hb)	3,00 ± 1,16	3,15 ± 1,22
GPx (µmol/min/g Hb)	31,18 ± 9,59	27,97 ± 6,83
HE (%)	6,96 ± 2,41	7,58 ± 3,09
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	22,79 ± 14,80	21,17 ± 9,23
GSSG (nmol/ml)	20,87 ± 6,81	19,65 ± 7,43
GSSG/GSH	1,93 ± 2,14	1,21 ± 1,00
TBARS (nmol/ml)	0,98 ± 0,37	1,04 ± 0,34

Mitjanes i desviacions estàndard dels biomarcadors en el grup de dones embarassades amb anèmia a la setmana 26 de gestació (ANÈMIA) i el grup d'embarassades sense anèmia (NO ANÈMIA). La n és el nombre d'individus. * indica diferències significatives entre els dos grups ($p < 0,05$).

Les TBARS d'eritròcit i plasma van disminuir significativament en les dones embarassades, igual que el test d'hemòlisi. En primer lloc, aquesta disminució de les TBARS respecte el grup control no va coincidir amb estudis anteriors d'alguns autors. Lachili i col·ls., per exemple, troben un nivell de lipoperoxidació elevat en dones embarassades i que prenen ferro (*Biol Trace Elem Res*, 2001).

No obstant, aquesta contradicció en aquest paràmetre és un fet repetit en altres malalties estudiades en aquest treball, com ara en la IR, la MPOC o la sèpsia. Aquest fet pot ser degut, com hem dit anteriorment, a les dificultats de la tècnica per evitar el soroll de fons. Per descartar problemes tècnics caldria provar de substituir la determinació de les TBARS per la dels diens conjugats, que mesuren el mateix paràmetre. Tot i així, estudis realitzats en el nostre laboratori (Romeu i col·ls., *Life Science*, 2002; Mulero i col·ls., *J Toxicol Environ Health*, 2006) van demostrar la eficàcia de les TBARS en detectar la lipoperoxidació produïda com a conseqüència d'una situació prooxidants com pot ser l'exposició a la llum UV. En segon lloc, la disminució de l'hemòlisi i, per tant, de la susceptibilitat dels eritròcits a un atac prooxidant, pot haver estat conseqüència de l'administració del ferro. Encara que pugui resultar paradoxal, el ferro pot ser essencial per al bon funcionament de la cèl·lula i, a la vegada, pot actuar com a inductor d'estrès oxidatiu, sobretot en els casos de sobrecàrrega de ferro. En les dones embarassades, tot i que podia haver induït un estrès oxidatiu, també podia haver augmentat la resistència dels eritròcits en front d'un atac radicalar.

8. DISTRÈS OXIDATIU EN L'ESTRÈS PSICOLÒGIC

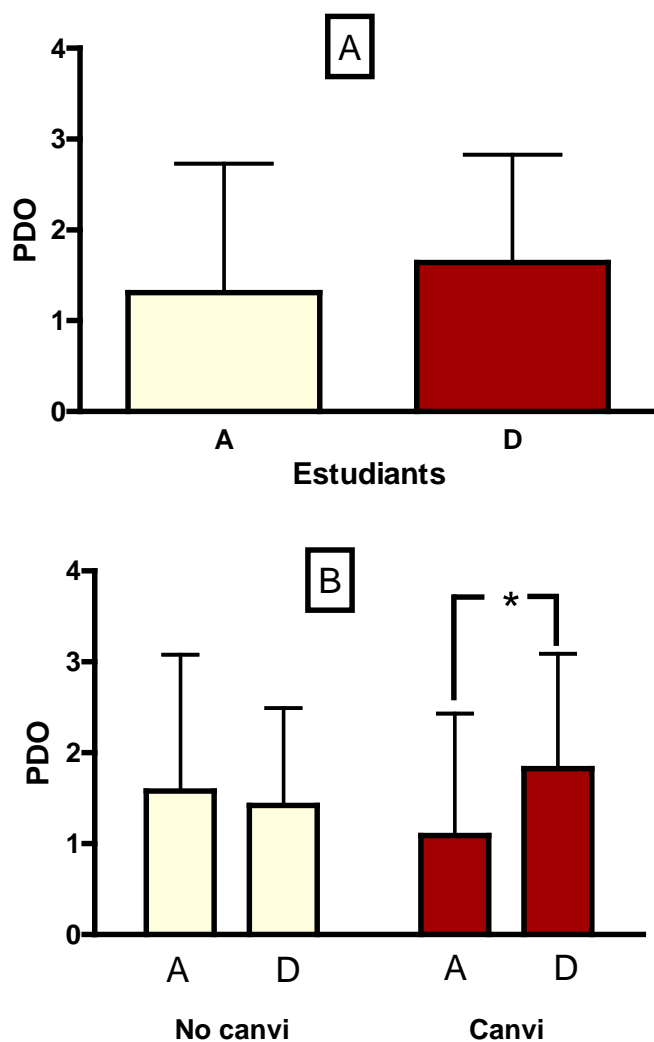
L'estrès psicològic i els desordres psiquiàtrics comporten una sèrie de canvis bioquímics entre els quals hi pot haver l'efecte tòxic de les ERO i el consegüent estrès oxidatiu (Lesgards i col·ls., 2002). En el nostre treball es va mesurar l'estat de la balança prooxidant-antioxidant en una situació estressant psicològicament però no relacionada amb desordres psiquiàtrics. Per aquesta raó, els resultats que es van obtenir en estudiants durant els exàmens poden ser extrapolats a altres situacions, com ara l'estrès laboral, però no a alteracions mentals de tipus patològic.

La PDO de l'anàlisi realitzada abans dels exàmens va ser de $1,31 \pm 1,42$ punts. Després dels exàmens universitaris, els estudiants van obtenir una PDO lleugerament superior ($1,64 \pm 1,18$ punts) però aquesta diferència no era significativa. Per tant, en valorar l'oxidació de manera global, es veia que l'estrès oxidatiu que tenien els estudiants no es correlacionava amb l'estrès psicològic que comporta el període d'exàmens (figura 19A)

El qüestionari sobre el canvi d'hàbits durant el període d'exàmens revelava que, en la majoria dels casos, els estudiants dormien menys, van augmentar del consum de begudes riques en cafeïna, gairebé no feien exercici físic i s'alimentaven pitjor. En tots els casos es va comprovar, mitjançant una entrevista, que els alumnes no van prendre complements vitamínics ni rics en antioxidants, així com que no van fumar. Per tant vam poder eliminar els efectes d'una aportació exògena d'antioxidants i d'ERO.

Al dividir la població en subgrups segons els canvis d'hàbits, vam observar que els estudiants que no van variar els seu hàbits diaris tenien una PDO d' $1,57 \pm 1,50$ abans dels exàmens i de $1,42 \pm 1,07$ després, sense diferència significativa. Mentre que en els estudiants amb canvis d'hàbits, la PDO augmentava significativament ($1,08 \pm 1,34$ vs $1,83 \pm 1,27$). En la figura 19B es mostra la diferència de PDO abans i després dels exàmens en el subgrup que declarava haver canviat algun dels seus hàbits diaris (Canvi) i en el subgrup que no havia canviat res en el seu estil de vida durant aquest període de temps (No canvi). Els individus que van conservar un estil de vida saludable (No canvi) van obtenir una PDO un 16 % menor després dels exàmens que abans, mentre que aquells que van introduir hàbits no saludables en el seu estil de vida augmenten la PDO de manera significativa, en un 74 %.

Figura 19. PDO abans i després dels exàmens de tots els estudiants (A) i dels grups amb i sense canvis d'hàbits diaris en el període d'entre els exàmens (B)



A: PDO abans dels exàmens i després dels exàmens; **B:** PDO abans dels exàmens (A) i després dels exàmens (D) en dos grups, els que han variat algun dels hàbits diaris (Canvi), i el que han seguit conservant els hàbits diaris saludables (No canvi).

Quan vam fer l'estudi de la puntuació separant la població segons el sexe o l'ensenyament no hi havia diferències significatives.

A la taula següent (taula XIX) es detallen els valors dels biomarcadors abans i després del període d'exàmens. En eritròcits, el GSH va disminuir, i el GSSG i la ràtio GSSG/GSH van augmentar després dels exàmens. En plasma, tan el GSH com el GSSG van disminuir, però la ràtio GSSG/GSH va augmentar significativament. Com ja hem dit en aquest treball, aquests canvis eren indicadors d'estrès oxidatiu. Pel que fa als enzims, la TS-GST i R-GST disminuïen els seus valors després dels exàmens, per tant, la capacitat de detoxificació de tòxics oxidants era menor. La SOD no va variar entre les dues analítiques, en canvi, la CAT i la GR van augmentar i la GPx va disminuir significativament.

Finalment, el biomarcador de la lipoperoxidació, TBARS, va disminuir significativament entre la primera i la segona analítica. És a dir, els individus van obtenir resultats que indicaven menys dany oxidatiu després dels exàmens que abans.

Taula XIX. Biomarcadors del distrès oxidatiu abans i després dels exàmens universitaris

BIOMARCADORS	ESTUDIANTS ABANS (n=42) MITJANA ± DE	ESTUDIANTS DESPRÉS (n=42) MITJANA ± DE
<i>Eritròcits</i>		
T-GST (µmol/min/g Hb)	1,50 ± 0,69	1,65 ± 0,42
TS-GST (µmol/min/g Hb)	0,24 ± 0,17	0,22 ± 0,28 *
R-GST (%)	16,09 ± 8,02	12,34 ± 13,76 *
GSH (µmol/g Hb)	3,42 ± 1,44	2,78 ± 0,97 *
GSSG (µmol/ g Hb)	1,44 ± 0,32	1,76 ± 0,64 *
GSSG/GSH	0,52 ± 0,31	0,74 ± 0,44 *
TBARS (nmol/g Hb)	1,21 ± 0,55	0,63 ± 0,60 *
SOD (U/g Hb)	1996,81 ± 433,06	2092,47 ± 529,47
CAT (mmol/min/g Hb)	182,84 ± 29,15	209,06 ± 38,55 *
GR (µmol/min/g Hb)	2,17 ± 0,70	2,83 ± 0,83 *
GPx (µmol/min/g Hb)	21,72 ± 7,47	15,99 ± 5,14 *
<i>Plasma</i>		
GSH (nmol/ml)	31,23 ± 7,24	14,66 ± 5,93 *
GSSG (nmol/ml)	30,73 ± 7,22	23,82 ± 5,17 *
GSSG/GSH	1,04 ± 0,35	1,89 ± 0,85 *
TBARS (nmol/ml)	1,19 ± 0,30	0,90 ± 0,19 *

Mitjanes i desviacions estàndard dels biomarcadors en el grup d'estudiants abans dels exàmens i després dels exàmens. La n és el nombre d'individus. *indica diferències significatives entre els dos grups ($p < 0,005$).

Alguns autors descriuen canvis en els biomarcadors de l'estrès oxidatiu relacionats amb l'estrès psicològic, molts cops relacionats en canvis en l'estil de vida saludable. Per exemple, no dormir augmenta els nivells de TBARS en l'orina d'individus sans (Kosugi i col·ls., *Biol Pharm Bull*, 1994) o els exàmens de medicina augmenten el trencament del DNA en limfòcits, la capacitat oxidativa dels lípids i disminueixen la

capacitat antioxidant del plasma (Sivonova i col·ls., *Stress*, 2004). Lesgards i col·ls. comenten que en relació als hàbits nutricionals van observar que quan disminueix el consum de peix, vegetals i fruites la capacitat antioxidant és menor i també és més baixa segons el grau d'estrès psicològic avaluat amb un qüestionari d'estil de vida (*Environ Health Perspect*, 2002).

Tot i que la PDO no variava entre els dos grups, molts dels biomarcadors havien canviat significativament després dels exàmens. Vàrem calcular el percentatge de biomarcadors que van canviar (taula XX). Aquest percentatge no ens donava cap informació sobre l'estat oxidatiu de l'individu però ens indicava si l'individu havia sofert grans canvis metabòlics entre la primera i la segona anàlisi.

Taula XX. Percentatges de biomarcadors que canvien abans i després dels exàmens

GRUP	n	% CANVIS
<i>Total dels estudiants</i>	42	80%
<i>Estudiants homes</i>	16	60%
<i>Estudiants dones</i>	26	67%
<i>Estudiants sense canvis en els hàbits saludables</i>	19	60%
<i>Estudiants amb canvis en els hàbits saludables</i>	23	73%
<i>Estudiants de Medicina</i>	24	73%
<i>Estudiants de Fisioteràpia</i>	8	53%
<i>Estudiants de Nutrició</i>	10	40%

Percentatges dels biomarcadors que canvien significativament ($p < 0,05$) entre l'anàlisi realitzada als estudiants universitaris abans i la de després dels exàmens. La n és el nombre d'individus.

Per veure quin era el col·lectiu d'estudiants que sofrien més variacions en la seva analítica, aquest percentatge es va calcular separant per sexes, segons si conservaven o no un estil de vida saludable i segons l'ensenyament del qual havien realitzat els exàmens. Els biomarcadors de les dones van variar més que els dels homes. Els estudiants que havien introduït canvis en el seu estil de vida tenien més variacions en els biomarcadors. Finalment, els alumnes de la llicenciatura de medicina tenen més canvis que els de la diplomatura de fisioteràpia i, aquests tenien més variacions en els biomarcadors que els que estudien nutrició humana. Així, podríem dir que els canvis metabòlics que pateixen els estudiants en certes molècules, si es mesuren abans dels exàmens i després, són majors en aquells que cursen ensenyaments amb un grau més alt de dificultat (taula XX).

En definitiva, no podem parlar d'un augment de l'estrès oxidatiu causat per la pressió psicològica que comporta els exàmens universitaris, però sí de canvis metabòlics nombrosos en les molècules que formen part del sistema antioxidant de l'individu. A més, els individus sotmesos a un estrès psicològic i que empitjoren els seus hàbits de vida saludable, sí que mostren un nivell d'estrès oxidatiu significativament més elevat que aquells que conserven els hàbits saludables.

9. PUNTUACIÓ ESTADÍSTICA DISCRIMINANT

L'anàlisi dels discriminants és una eina estadística que permet separar en grups un conjunt d'individus a partir de les diferències numèriques de les variables estudiades en tots ells, en el nostre cas, del conjunt de biomarcadors del distrès oxidatiu. Per dur-lo a terme totes les variables han de tenir una distribució normal, per això aquells biomarcadors que no complien el requisit es van recalculer fent el logaritme amb base 10 i es va comprovar que d'aquesta manera la distribució dels valors era normal.

En el nostre treball, aquest test estadístic es va aplicar als grups que s'han descrit en els anteriors apartats. El test s'ha realitzat, doncs, en els següents grups d'individus:

- controls sans i individus amb IR
- individus amb IR abans del tractament amb EPO i sis mesos després del tractament
- controls sans i individus amb MPOC
- controls sans de menys de 50 anys, d'entre 51 i 65 anys i de més de 65 anys
- controls sans homes i dones
- dones no embarassades i dones embarassades
- dones embarassades amb i sense anèmia
- estudiants universitaris abans i després dels exàmens
- estudiants universitaris que han canviat i que no han canviat els seus hàbits diaris

L'estudi del distrès oxidatiu dels individus amb sèpsia i infart no s'ha inclòs en aquesta part de la tesi ja que el nombre d'individus de cada grup és massa reduït.

El test dels discriminants distribueix els casos introduïts en dos o més subgrups, segons es marqui, basant-se en els resultats numèrics dels biomarcadors i sense conèixer el subgrup al qual pertany cada cas realment. Un cop classificats ens proporciona tres dades importants:

1. El percentatge d'individus que s'han classificat correctament en cada un dels grups implicats en l'anàlisi.
2. Els biomarcadors que s'han inclòs en l'equació discriminant i la puntuació que rep cada individu segons aquesta equació.
3. La significació referent a les diferències estadístiques entre els dos o més subgrups creats.

Per dur a terme l'anàlisi dels discriminants es van introduir tots els biomarcadors estudiats en aquesta tesi. No obstant, el test només va utilitzar aquells biomarcadors que li van servir per a separar estadísticament els individus en grups. A més, el test dels discriminants va construir una equació amb els biomarcadors utilitzats i va assignar a cada individu una puntuació discriminant. Per tant, en cada un dels estudis (IR, MPOC, edat, sexe, embaràs i estrès psicològic), els biomarcadors utilitzats van ser diferents.

Així, una de les diferències més importants entre la puntuació discriminant i la PDO és que en la puntuació discriminant s'utilitzen només aquells biomarcadors que permeten diferenciar els grups implicats en l'anàlisi estadístic, i la PDO utilitza tots els biomarcadors que s'han estudiat en aquesta tesi per a assignar una puntuació a cada individu.

Els biomarcadors que s'utilitzen en cada un dels estudis i la puntuació discriminant es mostren a les taules XXI-XXX.

9.1. DISCRIMINANTS EN LA INSUFICIÈNCIA RENAL

En anteriors apartats d'aquesta tesi s'ha evidenciat la presència d'estrès oxidatiu en la IR. La PDO era marcadament superior en malalts renals i nombrosos biomarcadors estaven alterats en relació a un grup d'individus control.

Tal com es pot veure a la taula XXI, el test dels discriminants també diferencia amb èxit els individus control dels malalts. En ambdós casos més del 80 % dels individus d'aquest estudi eren identificats correctament. A més, la mitjana de puntuació discriminant dels individus amb IR era significativament diferent a la que van obtenir els individus del grup control. Finalment, els biomarcadors que utilitza el test estadístic dels discriminants per a construir l'equació i assignar una puntuació a cada individu són la T-GST i la TS-GST, la ràtio GSSG/GSH d'eritròcit i de plasma i l'HE.

Taula XXI Valoració global del distrès oxidatiu en la IR

		DISCRIMINANTS				PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
84,1	82,5	T-GST TS-GST GSSG/GSH eritròcit HE GSSG/GSH plasma	-1,02 ± 0,87	1,02 ± 1,11	<0,001	0,00 ± 0,69	1,13 ± 1,75	<0,001

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups "control" i "IR". %G1 indica el % d'individus "control" que els discriminants pronostiquen com a "control"; %G2 indica el % d'individus "IR" que els discriminants pronostiquen com a "IR"; PUNTS G1 són els punts del grup "control"; PUNTS G2 són els punts del grup "IR"; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard.

Com ja hem dit en aquesta tesi, el sistema glutatió és un dels grups de biomarcadors més afectats en la IR. Els biomarcadors que es trobaven alterats en els malalts amb IR eren el GSSG i la ràtio GSSG/GSH en eritròcit i el GSH i GSSG en plasma. El test dels discriminants té en compte la ràtio GSSG/GSH d'eritòcit i plasma per a puntuar els individus, per tant, es confirma un cop més l'alteració del sistema del glutatió en malalts renals.

Tant en l'anàlisi dels biomarcadors, de manera individual, com en l'anàlisi dels discriminants s'observaven canvis en els paràmetres plasmàtics del glutatió, en canvi, en la PDO aquests valors no es tenen en compte. La PDO pretén ser aplicable a qualsevol situació fisiològica o patològica, per conèixer el grau de distrès oxidatiu d'un individu, per tant, no es replanteja la possibilitat d'incorporar els paràmetres plasmàtics relacionats amb el glutatió perquè no tenim evidències que aquests valors puguin ser informatius en qualsevol situació i, a més, s'havien trobat, en la literatura, resultats contradictoris.

La GST també tenia importància a l'hora d'analitzar els biomarcadors alterats en la IR, així, es van observar variacions en la GST total i en el % residual. Com es veu a la taula XXI, el test dels discriminants va incloure aquest enzim en l'anàlisi, en aquest cas la GST total i la termoestable. Per tant, els resultats tornen a ser coincidents en l'estudi dels biomarcadors i en el test dels discriminants.

Finalment, els discriminants inclouen l'hemòlisi en l'anàlisi. Aquest fet confirma que la susceptibilitat dels eritròcits a l'oxidació es veu augmentada en els malalts amb IR.

En l'apartat on s'analitza el distrès oxidatiu en la IR, s'ha comentat que els TBARS, tot i ser un biomarcador de lipoperoxidació molt utilitzat en altres estudis, no augmenten en el nostre treball. Una altra evidència que aquest biomarcador, tant en plasma com en eritròcit, no és informatiu, és el fet que el test dels discriminants no l'utilitza en el seu anàlisi.

9.2. DISCRIMINANTS EN LA INSUFICIÈNCIA RENAL: TRACTAMENT AMB EPO

Segons els resultats de la PDO presentats en un apartat anterior, el tractament amb EPO no indueix ni elimina l'estrès oxidatiu en els malalts amb IR.

El test estadístic dels discriminants va classificar aproximadament el 60 % dels individus correctament. És a dir, el 40 % dels individus que no han iniciat el tractament amb EPO els va reconèixer com a persones en tractament, i el 40 % d'individus tractats durant sis mesos els va reconèixer com a persones no tractades. No obstant, la puntuació discriminant és significativament diferent en els dos grups. Per a construir l'equació que s'utilitza per assignar la puntuació discriminant, el test només va tenir en compte els valors de la GPx. Tots aquests resultats es poden veure a la següent taula:

Taula XXII. Valoració global del distrès oxidatiu abans i després del tractament amb EPO (EPO 0 i EPO 1) en la IR

DISCRIMINANTS						PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
64,3	59,5	GPx	-0,22 ± 0,79	0,29 ± 1,15	<0,05	0,80 ± 1,95	0,93 ± 1,92	NS

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups "EPO0" i "EPO1". %G1 indica el % d'individus "EPO 0" que els discriminants pronostiquen com a "EPO 0"; %G2 indica el % d'individus "EPO 1" que els discriminants pronostiquen com a "EPO 1"; PUNTS G1 són els punts del grup "EPO 0"; PUNTS G2 són els punts del grup "EPO 1"; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

En l'anàlisi individual dels biomarcadors (taula X) vam veure que només dues variables eren significativament diferents entre els grups abans i després del tractament amb EPO: hi havia un augment del GSH en eritròcits i una disminució de la SOD. L'augment de la GPx observat en anteriors apartats no era significatiu, per tant, no podem justificar el motiu pel qual el test dels discriminants ha escollit aquest biomarcador com a únic paràmetre que és capaç de separar els individus que no han estat tractats amb EPO i aquells que s'han tractat durant sis mesos. Ceballos-Picot va observar un augment de la GPx en malalts amb IR, però cap d'ells s'havia tractat amb EPO (*Free Radic Biol Med*, 1996).

Tot i que alguns autors donen a la EPO un paper prooxidant (Németh i col·ls., *Pediatr Nephrol*, 2000), els resultats de la PDO només indicaven un lleuger augment, no significatiu, de l'estrès oxidatiu després del tractament amb EPO i, encara que els discriminants sí que diferencien les dues poblacions, no considerem que una equació basada només en els valors de la GPx pugui ser utilitzada per a valorar el nivell d'estrès oxidatiu d'aquests individus. A més, el percentatge d'error en la classificació dels malalts renals abans i després del tractament amb EPO és massa alt.

Una altra gran diferència entre la PDO i el test dels discriminants és que el valor de puntuació en la PDO ens indica el sentit del distrès oxidatiu, és a dir, si l'individu té estrès oxidatiu (puntuacions positives), si està en equilibri (zero punts) o si està en un estat antioxidant (puntuacions negatives), i la PDO també ens indica el grau del distrès, per exemple, un individu amb PDO= 0,80 té menys estrès oxidatiu que un individu amb PDO = 0,93.

En canvi, els valors positius i negatius de la puntuació discriminant no tenen relació amb el sentit del distrès oxidatiu sinó que tan sols són el resultat de l'equació obtinguda en l'anàlisi, que utilitza els valors reals dels biomarcadors, sense substituir-los per 1, -1 o 0, com es fa en el cas de la PDO. És a dir, encara que el grup de malalts no sotmesos a hemodiàlisi ni tractats amb EPO obtinguin una puntuació discriminant de -0,22 no significa que estiguin en un estat antioxidant. Així, el valor informatiu de la PDO és molt més gran que el de la puntuació discriminant.

9.3. DISCRIMINANTS EN LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

En la figura 13, es pot comprovar que la PDO del grup amb MPOC era significativament superior a la dels individus sans, és a dir, que l'estrès oxidatiu estava present en aquesta malaltia. Com ja s'ha comentat en aquesta tesi, el tabac hi juga un paper molt important ja que és una font exògena de radicals lliures i espècies reactives de l'oxigen. El test dels discriminants també separa clarament els dos grups, sa i malalt, ja que més del 85 % dels individus eren classificats correctament, i la puntuació discriminant era significativament diferent entre els grups (taula XXIII). Els biomarcadors que té en compte el test són les TBARS d'eritrocit i plasma i la GPx.

Taula XXIII. Valoració global del distrès oxidatiu en la MPOC

		DISCRIMINANTS				PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
85,7	92,9	TBARS eritròcit GPx TBARS plasma	1,46 ± 1,13	-1,46 ± 0,84	<0,001	0,14 ± 0,77	1,14 ± 1,70	<0,05

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups "control" i "MPOC". %G1 indica el % d'individus "control" que els discriminants pronostiquen com a "control"; %G2 indica el % d'individus "MPOC" que els discriminants pronostiquen com a "MPOC"; PUNTS G1 són els punts del grup "control"; PUNTS G2 són els punts del grup "MPOC"; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard.

En l'apartat 3 també es van analitzar els biomarcadors en aquest grup, i tan sols la GR i la GPx indicaven un possible estrès oxidatiu en els pacients amb MPOC. A més, contràriament al que s'esperava, les TBARS i l'hemòlisi disminuïen. El càlcul del nivell d'estrès oxidatiu mitjançant la PDO era més sensible que la valoració dels biomarcadors de manera individual, ja que les mitjanes de cada un dels paràmetres poden amagar valors extrems que denoten estrès oxidatiu.

En un primer moment, els resultats fan pensar que les dues puntuacions, PDO i discriminant, permetien concloure que la MPOC va acompanyada d'un estrès oxidatiu ja que es diferencia significativament d'un grup control sa, no obstant, quan analitzem els biomarcadors que utilitza el test dels discriminants per a separar els grups control i MPOC (TBARS d'eritròcit i plasma i GPx) aquesta conclusió no és tan clara. Dotan i col·ls. (*Prog Lipid Res*, 2004) expliquen en el seu treball les limitacions del mètode de les TBARS, que també s'han comentat en el nostre treball, a més, els resultats de les TBARS és més alt en el grup control que en el de malalts, és a dir, paradoxalment la lipoperoxidació és major en els individus sans que en els malalts. Per tant, tenint en compte que no és possible que la població sana tingui més estrès oxidatiu que la població amb MPOC, el test dels discriminants no ens aporta informació vàlida ni és possible tenir-lo en compte per a la valoració global del distrès oxidatiu en una població amb MPOC.

9.4. DISCRIMINANTS EN L'ENVELLIMENT

En l'anterior apartat d'envelliment hem vist que la PDO no augmentava amb l'edat, no obstant, el dany oxidatiu es planteja com a causa i conseqüència de l'envelliment en molts estudis realitzats per altres autors.

En el nostre treball es van dividir les persones sanes en tres grups segons l'edat (menys de 50, entre 51 i 65 anys i més de 65 anys). El test dels discriminants va ser capaç de reconèixer el 80% dels individus del tercer rang d'edat, mentre que més de la meitat dels individus més joves els classificava com del grup intermedi i viceversa (taula XXIV). La puntuació discriminant es diferenciava de manera significativa en el tercer grup d'edat (G3) respecte els altres dos grups (G1 i G2), i no hi havia diferències entre els grups G1 i G2. En l'anàlisi discriminant van intervenir els següents biomarcadors: GSH eritrocitari, GSSG/GSH plasmàtic i GR.

Tots aquests resultats es poden veure en la següent taula:

Taula XXIV. Valoració global del distrès oxidatiu en l'envelliment

			DISCRIMINANTS					PDO			
% G1	% G2	% G3	BIOM.EN L'ANÀLISI	P G1	P G2	P G3	<i>p</i>	P G1	P G2	P G3	<i>p</i>
45,3	41,5	81	GSH eritrocit	-0,28	-0,28	1,27	<0,001	0,23	0,05	0,14	NS
			GR	±	±	±		±	±	±	
			GSSG/GSH plasma	0,96	1,14	0,77		0,80	0,70	0,96	

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups de <de 50 anys (G1), entre 51 i 65 anys (G2) i > de 65 anys (G3). %G1 indica el % d'individus < de 50 anys que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % d'individus d'entre 51 i 65 anys que els discriminants pronostiquen correctament i %G3 indica el % d'individus > de 65 anys que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup < de 50 anys; PUNTS G2 són els punts del grup d'entre 51 i 65 anys i PUNTS G3 són els punts del grup > de 65 anys; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

Quan es van analitzar els biomarcadors de manera individual (apartat 5) tampoc es van trobar diferències entre els grups de menys de 50 anys i d'entre 51 i 65 anys en cap de les variables. No obstant, quan vam comparar els individus del grup G1 i G2 amb els del grup G3 vam veure que el GSH eritrocitari i plasmàtic era menor, el quocient GSSG/GSH eritrocitari i plasmàtic més alt i la GR més alta en els individus més grans. Aquestes variacions eren indicadores d'un major grau d'oxidació en els individus de més de 65 anys que en els més joves, però no podem parlar d'estrès oxidatiu ja que els valors obtinguts en tots els grups entraven dins dels rangs de normalitat establerts en aquesta tesi, i aquest és el motiu pel qual la PDO no és capaç d'evidenciar un desequilibri major en la balança prooxidant-antioxidant en els individus de la tercera edat. Finalment, caldria reiterar la importància d'ampliar el tercer rang d'edat amb individus més representatius de la població general ja que, com s'ha dit en l'apartat de l'envelliment, els individus d'aquest grup pertanyien a un col·lectiu de persones més sanes del que és habitual.

9.5. DISCRIMINANTS EN EL GÈNERE

El gènere també influeix en certa manera en el grau d'estrès oxidatiu en humans. En l'apartat 6 d'aquesta tesi s'han presentat els resultats de la PDO en homes i dones, tot i que els resultats no eren significatius, hi ha via una tendència en els homes a tenir un estrès oxidatiu més alt que en les dones.

El test dels discriminants classifica correctament un 76,3 % dels homes i un 68,8 % de les dones utilitzant els següents biomarcadors del distrès oxidatiu: TS-GST, TBARS d'eritrocit i SOD. A més, la puntuació discriminant es diferencia significativament els homes i les dones (taula XXV).

Taula XXV. Valoració global del distrès oxidatiu segons el sexe

		DISCRIMINANTS				PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
76,3	68,8	TS-GST TBARS eritrocit SOD	-0,68 ± 0,81	0,33 ± 1,08	<0,001	0,34 ± 1,07	0,05 ± 0,60	NS

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'homes i de dones. %G1 indica el % d'homes que els discriminants pronostiquen com a homes; %G2 indica el % de dones que els discriminants pronostiquen com a dones; PUNTS G1 són els punts del grup d'homes; PUNTS G2 són els punts del grup de dones; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

Els biomarcadors que donaven resultats significativament diferents entre els homes i les dones, quan es van estudiar de manera individual (apartat 3), eren els següents: TS-GST, R-GST, TBARS d'eritrocit, SOD i GR. Per tant, la importància dels tres biomarcadors que utilitza el test dels discriminants per a dur a terme el seu anàlisi ja s'ha comentat anteriorment en aquest treball. En resum, la disminució de la GST indicava una menor protecció en homes en relació a l'atac de les ERO i la SOD més baixa en homes es considerava fruit de l'esgotament d'aquesta molècula. La menor quantitat de TBARS en homes era un paràmetre que, paradoxalment, indicava una menor lipoperoxidació en el grup masculí.

De la mateixa manera que va ocórrer en el cas de l'edat, la PDO no va ser diferent entre homes i dones. Tots els individus d'aquest estudi són sans, per això sembla coherent que la PDO tingués uns valors molt pròxims a 0 punts en ambdós grups.

El test dels discriminants sí que va ser capaç de separar significativament els homes i les dones mitjançant paràmetres relacionats amb el distrès oxidatiu, no obstant, és impossible determinar quin dels grups té més o menys estrès oxidatiu ja que, com hem comentat anteriorment, els valors positius o negatius de la puntuació discriminant no s'interpreten com a indicadors d'estrès oxidatiu o d'estat antioxidant respectivament, tan sols són el resultat numèric de la combinació dels biomarcadors que utilitza el test.

Per determinar en quin sentit eren diferents els homes i les dones, es va recórrer a l'anàlisi dels biomarcadors. Les variacions de la TS-GST i la SOD eren indicadores de major estrès oxidatiu en homes i les TBARS indicaven major estrès oxidatiu en dones, per tant, amb aquesta informació tampoc es podia assegurar que els homes o les dones tinguessin més estrès oxidatiu.

Aquests resultats contradictoris ens van fer pensar que el test dels discriminants no és un bon mètode de valoració global del distrès oxidatiu, la informació que ens aporta no és suficient i pot donar lloc a interpretacions errònies, per tant, no el podem utilitzar com a única eina de valoració del distrès oxidatiu.

9.6. DISCRIMINANTS EN L'EMBARÀS

Els canvis metabòlics que acompanyen l'embaràs inclouen un augment de l'estrès oxidatiu, aquest fet es va comprovar amb el resultat de la PDO, que era significativament més alta en dones embarassades quan les comparàvem amb dones no embarassades de la mateixa edat.

El test dels discriminants va permetre separar correctament els dos grups, el 100 % de les dones no embarassades i el 93,5 % de les dones embarassades eren classificades correctament. La puntuació discriminant va ser significativament diferent en els dos grups i l'equació que va donar lloc a aquesta puntuació es va construir amb els següents biomarcadors: R-GST, GSH i TBARS eritrocitàries i HE (taula XXVI).

Taula XXVI. Valoració global del distrès oxidatiu en l'embaràs

		DISCRIMINANTS				PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
93,5	100	R-GST GSH eritrocit TBARS eritrocit HE	2,98 ± 1,18	-1,57 ± 0,89	<0,001	0,06 ± 0,51	1,41 ± 1,37	<0,001

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'embarassades (G2) i no embarassades (G1). %G1 indica el % de no embarassades que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % d'embarassades que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup de no embarassades; PUNTS G2 són els punts del grup d'embarassades; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard.

El conjunt de biomarcadors que es van incloure en el test dels discriminants ja mostraven diferències significatives entre ambdós grups (taula XVII). Com hem dit en l'apartat 7, l'enzim GST i el GSH estava disminuït en les dones embarassades, implicant una pitjor detoxificació de les ERO presents i un consegüent augment de l'estrès oxidatiu. S'administrava ferro al conjunt de dones gestants, per això els eritrocits semblaven ser més resistents a la lipoperoxidació i menys susceptibles a l'atac de les ERO, aquest fet es traduïa en nivells baixos de les TBARS i del test d'hemòlisi respectivament. Per tant, tot i que el test dels discriminants va separar molt bé els dos grups, va utilitzar dos resultats de biomarcadors que denoten estrès oxidatiu i dos resultats de biomarcadors que impliquen repòs oxidatiu. Això dificulta la interpretació dels resultats i fa impossible afirmar la presència o absència d'estrès oxidatiu en les dones embarassades.

En el context de l'embaràs, doncs, també s'ha demostrat que la PDO és molt més sensible i informativa que la puntuació discriminant, i que representa de manera més real l'estat de la balança prooxidant-antioxidant en nombroses situacions patològiques i fisiològiques.

9.7. DISCRIMINANTS EN L'ANÈMIA LIGADA A L'EMBARÀS

Totes les dones embarassades van prendre ferro tal i com es detalla a l'apartat de material i mètodes d'aquesta tesi. El subgrup de dones gestants que tenien anèmia en el moment de la determinació del distrès oxidatiu obtenien una PDO més baixa que aquelles que no tenien anèmia. Aquest fet ens va dur a pensar que el ferro administrat a les dones no anèmiques els produïa una sobrecàrrega de ferro i, en conseqüència, tenien major estrès oxidatiu.

El test dels discriminants va tenir dificultats a l'hora de classificar les dones embarassades segons l'anèmia, el 70 % de les dones amb anèmia es van classificar correctament mentre que només el 54 % de les dones sense anèmia es van classificar de manera correcta. No obstant, la puntuació discriminant era significativament diferent en aquests dos grups, i la R-GST i el GSH eritrocitari es van utilitzar per construir l'equació discriminant (taula XXVII).

Taula XXVII. Valoració global del distrès oxidatiu en embarassades amb i sense anèmia

		DISCRIMINANTS				PDO			
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	
70,3	54,5	R-GST GSH eritrocit	-0,42 ± 0,86	0,71 ± 1,20	<0,001	1,14 ± 1,27	1,86 ± 1,42	<0,05	

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'embarassades amb anèmia (G1) i sense (G2). %G1 indica el % de dones amb anèmia que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % de dones sense anèmia que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup d'anèmia; PUNTS G2 són els punts del grup de no anèmia; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard.

Com ja hem vist a la taula XVIII, aquests dos biomarcadors eren significativament diferents en les dones amb i sense anèmia: la R-GST era menor en les dones anèmiques, és a dir, tenien menys quantitat d'enzim, no obstant, el valor de GSH en l'eritròcit era significativament més alt en les dones anèmiques. Per tant, la puntuació discriminant es basa en dues variables que indiquen el contrari l'una de l'altra. Aquest fet reafirma la idea que el test dels discriminants per si sol no és adequat per valorar el grau de distrès oxidatiu d'una població, en el cas de l'anèmia, per exemple, ens va ser impossible determinar quin dels dos grups és el que té més estrès oxidatiu. En canvi, amb la PDO sí que es tenia una idea clara de quin era el grup més afectat per l'oxidació, ja que la nostra puntuació té en compte tot un conjunt de biomarcadors del distrès oxidatiu, i ens indica si el balanç final es decanta cap a una situació antioxidant o prooxidant.

Si la valoració de l'anèmia lligada a l'embaràs s'hagués realitzat només mesurant l'enzim GST, la conclusió hagués estat que l'anèmia va lligada a un estrès oxidatiu, si s'hagués fet la valoració determinant només el GSH, s'hauria arribat a la conclusió contrària. Per tant, es necessiten un conjunt de biomarcadors per determinar amb garanties el nivell d'estrès oxidatiu d'una població, i és important escollir acuradament els biomarcadors que utilitzem per tal que tots els sistemes implicats en el balanç antioxidant-prooxidant hi estiguin representats. Per tal que la valoració global del distrès oxidatiu es determini amb un mètode eficaç i aplicable a la clínica pràctica és important que es tracti d'una determinació automatitzada, però no basada exclusivament en criteris estadístics ja que, com hem vist en l'estudi de l'embaràs, això ens podria dur a conclusions errònies.

9.8. DISCRIMINANTS EN ELS ESTUDIANTS UNIVERSITARIS ABANS I DESPRÉS DELS EXÀMENS

Els exàmens universitaris són un exemple d'estrès psicològic, i l'estrès psicològic pot anar lligat a un augment de l'estrès oxidatiu. No obstant, en el nostre estudi, els estudiants obtenien una PDO lleugerament més alta després dels exàmens en relació a la obtinguda abans dels exàmens, però la diferència no era significativa.

El test dels discriminants va classificar correctament els estudiants abans i després dels exàmens, tan sols el 3,3 % dels individus que no havien realitzat els exàmens es van classificar de manera errònia. El test utilitza els següents biomarcadors per a dur a terme l'anàlisi: T-GST, GR i GPx en eritrocits, i TBARS, GSH i GSSG en plasma. L'equació construïda a partir d'aquests biomarcadors va atorgar una puntuació significativament diferent als estudiants abans i després dels exàmens (taula XXVIII).

Taula XXVIII Valoració global del distrès oxidatiu d'alumnes universitaris abans i després dels exàmens

		DISCRIMINANTS				PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
96,7	100	T-GST GR GPx TBARS plasma GSH plasma GSSG plasma	1,86 ± 1,02	-1,86 ± 0,98	<0,001	1,31 ± 1,42	1,64 ± 1,18	NS

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'abans dels exàmens (G1) i després (G2). %G1 indica el % d'alumnes abans dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % d'alumnes després dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup d'abans d'exàmens; PUNTS G2 són els punts del grup de després d'exàmens; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

A l'apartat 8 de resultats, s'especificaven els biomarcadors que varien abans i després dels exàmens. Com ja s'ha comentat, existien moltes variacions dels biomarcadors dels distrès oxidatiu, canvis metabòlics probablement lligats a l'estrès psicològic, no obstant, el còmput total d'aquests canvis no es traduïa en una variació del nivell global de distrès oxidatiu.

Algunes de les variacions en els biomarcadors utilitzats per l'anàlisi discriminant s'interpretaven com a reflex de l'augment de la peroxidació i uns altres eren indicadors d'un estat antioxidant, és a dir, un cop més el test dels discriminants ens separa correctament les dues poblacions però quan intentàvem interpretar els resultats ens trobàvem amb conclusions contradictòries. No podem dir, doncs, que el test dels discriminants sigui, en aquest estudi, una bona alternativa a la nostra PDO per a valorar globalment el distrès oxidatiu.

9.9. DISCRIMINANTS EN L'ESTIL DE VIDA DELS ESTUDIANTS UNIVERSITARIS

Com hem dit anteriorment, els hàbits de vida no saludables van lligats, en la literatura, a un nivell més elevat d'estrès oxidatiu. En el nostre estudi, només els alumnes que variaven el seu estil de vida durant els exàmens universitaris i el canviaven per hàbits menys saludables, obtenien una PDO significativament més alta després dels exàmens, i aquells que no variaven els seus hàbits saludables, tampoc tenien variacions en la PDO.

El test dels discriminants es va aplicar al subgrup d'individus que canviaven els seus hàbits (taula XXIX) i al subgrup que no introduïa canvis en el seu estil de vida (taula XXX).

En ambdós casos, el test discriminava correctament els alumnes segons si l'analítica s'havia realitzat abans o després dels exàmens. La puntuació discriminant era significativament diferent abans i després dels exàmens en els dos subgrups, però els biomarcadors utilitzats per a l'equació discriminant van ser diferents en el grup amb canvis (GSH, GSSG i TBARS plasmàtics) i sense canvis (GR, GPx i TBARS eritrocitaris i plasmàtics).

Taula XXIX. Valoració global del distrès oxidatiu d'alumnes universitaris que han fet canvis en l'estil de vida, abans i després dels exàmens

DISCRIMINANTS						PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
87	100	GSH plasma GSSG plasma TBARS plasma	1,62 ± 1,05	-1,62 ± 0,95	<0,001	1,08 ± 1,34	1,83 ± 1,27	<0,05

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'abans dels exàmens (G1) i després (G2). %G1 indica el % d'alumnes abans dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % d'alumnes després dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup d'abans d'exàmens; PUNTS G2 són els punts del grup de després d'exàmens; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

Taula XXX. Valoració global del distrès oxidatiu d'alumnes universitaris que no han fet canvis en l'estil de vida, abans i després dels exàmens

DISCRIMINANTS						PDO		
% G1	% G2	BIOM.EN L'ANÀLISI	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>	PUNTS G1	PUNTS G2	<i>p</i>
100	100	TBARS eritrocit GR GPx TBARS plasma	2,16 ± 1,01	-2,16 ± 0,99	<0,001	1,57 ± 1,50	1,42 ± 1,07	NS

Resultats del test dels discriminants i de la PDO en els grups d'abans dels exàmens (G1) i després (G2). %G1 indica el % d'alumnes abans dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; %G2 indica el % d'alumnes després dels exàmens que els discriminants pronostiquen correctament; PUNTS G1 són els punts del grup d'abans d'exàmens; PUNTS G2 són els punts del grup de després d'exàmens; es presenten les mitjanes ± la desviació estàndard. NS indica que no hi ha diferències significatives.

Un cop examinades les variacions dels biomarcadors, vam veure que, en ambdós subgrups, hi havia algunes variables amb un valor numèric que ens indicava estrès oxidatiu i d'altres variables que indicaven repòs antioxidant. Per això, la separació tan correcta dels estudiants abans i després dels exàmens que duu a terme el test dels discriminants no es correlaciona amb una separació dels estudiants segons tinguin més o menys estrès oxidatiu. No podríem dir, doncs, que els hàbits diaris no saludables augmenten l'estrès oxidatiu en els estudiants. En resum, el test dels discriminants reconeix els biomarcadors que tenen més diferències entre els dos grups per separar-los de manera òptima, però no és un bon mètode per determinar un augment o disminució de l'estrès oxidatiu en una situació d'estrès psicològic.

DISCUSSIÓ GLOBAL

DISCUSSIÓ GLOBAL

La incidència de les ERO en la salut dels individus és indubtable i, per tant, és important disposar de tècniques de rutina per valorar directa o indirectament la quantitat d'ERO produïdes i determinar l'activitat, la disponibilitat i l'efectivitat dels sistemes protectors anti-ERO.

En aquest treball, hem definit un conjunt de paràmetres que, valorats simultàniament, proporcionen una valuosa informació sobre el balanç oxidatiu global de l'individu.

Com ja s'ha comentat, la valoració puntual d'un paràmetre lligat a l'estrès oxidatiu resulta insuficient per determinar l'estat del balanç antioxidant-prooxidant, en situació normal o patològica, i ens aporta molt poca informació d'on està localitzat **el desequilibri**. Per exemple, els resultats de la PDO en la MPOC, la sèpsia i l'IAM indicaven clarament la presència d'estrès oxidatiu, no obstant, les TBARS de plasma no augmentaven respecte el grup control i les TBARS d'eritròcit fins i tot disminuïen en tots tres grups de pacients. Per tant, si haguéssim valorat només aquest biomarcador, haguéssim arribat a unes conclusions errònies, o, si més no, diferents.

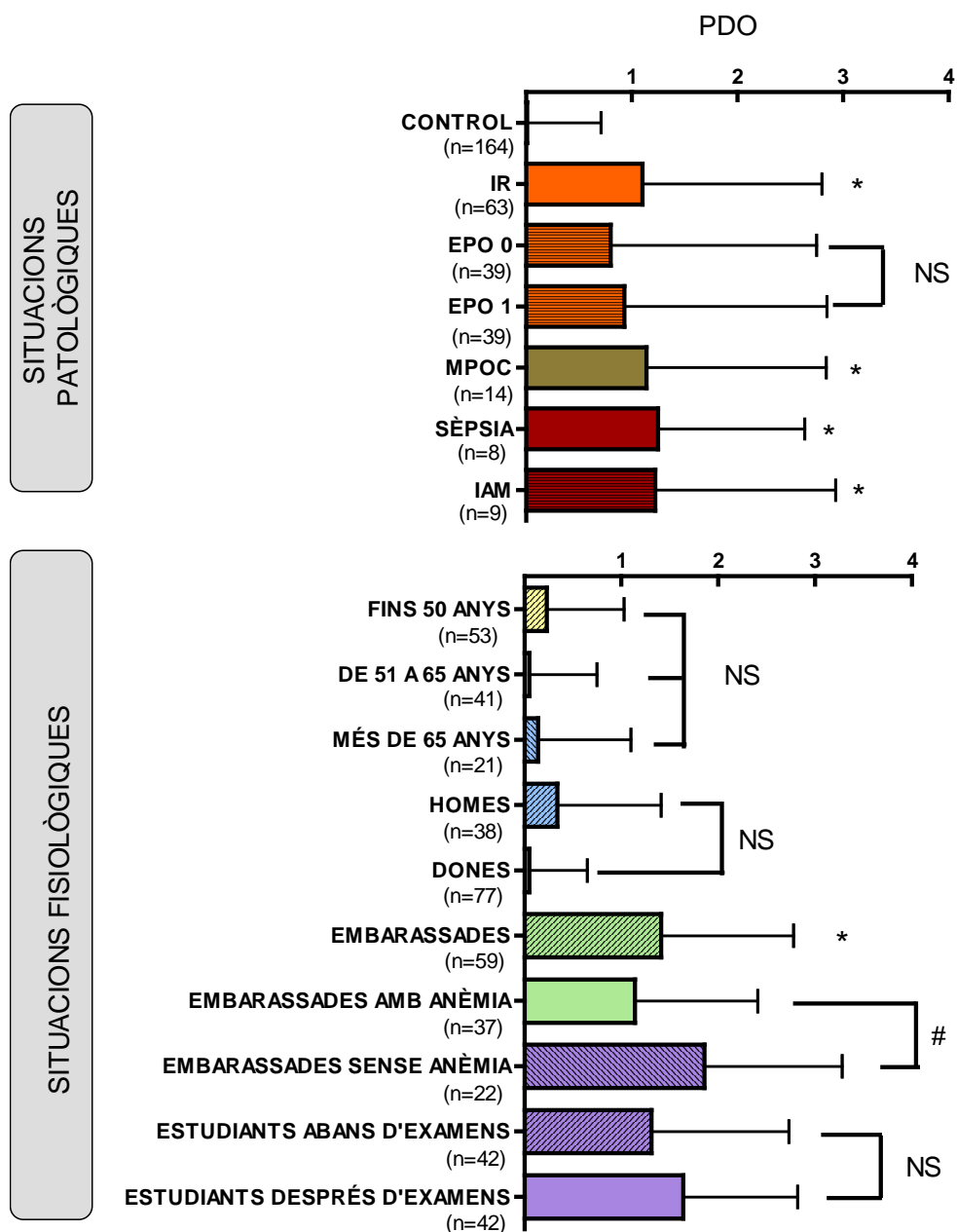
Per altra banda, hi ha una defensa primària i secundària enfront els radicals lliures. Aquest fet pot explicar que l'augment d'un enzim o sistema antioxidant impliqui, a vegades, una bona protecció, **defensa primària**, i altres cops evidenciï un excés de radicals que es tradueix en una sobreproducció d'antioxidants, **defensa secundària** o de resposta. De la mateixa manera, la disminució dels sistemes de protecció pot ser deguda al fet que no són necessaris, que els sistemes secundaris no s'activen, o a una disfunció en la seva producció, fet que conduiria a l'organisme a tenir estrès oxidatiu. Si determinéssim només un dels antioxidants, la interpretació dels resultats es faria molt difícil. Per aquest motiu, en el mètode de puntuació del distrès oxidatiu que proposem es valora cada biomarcador mitjançant fórmules matemàtiques que tenen en compte el valor del biomarcador respecte els rangs de normalitat, i també l'estat de la resta de biomarcadors.

A la figura 20 podem veure un resum de les mitjanes de la PDO obtingudes en les diferents situacions fisiològiques i patològiques estudiades. Hem aconseguit, doncs, obtenir una nova variable que ens dóna el grau d'estrès oxidatiu i ens permet saber o entendre, d'una manera ràpida, quin és el pes de l'estrès oxidatiu en els diferents grups estudiats sense necessitat de conèixer dades més complexes de tots els biomarcadors i el paper que juguen en la cèl·lula. En certa manera, la PDO és un paràmetre que es pot aplicar a la clínica, és fàcilment utilitzable i compleix els principis per poder transferir-la de l'àmbit de la recerca bàsica a la clínica.

La PDO dels individus control té una distribució normal centrada en el punt 0, fet indicador d'una no alteració del balanç antioxidant-prooxidant. Com s'observa en els resultats de la investigació, la població amb insuficiència renal mostra un grau d'estrès oxidatiu significativament superior a la població control.

La mitjana de la puntuació en pacients urèmics és de 1,1 punts. No tots els malalts renals de la població mostren un perfil d'estrès oxidatiu, igual que no tots els controls estan situats a 0 (figura 10B), aquesta variabilitat intraindividual posa en evidència, una vegada més, la complexitat de tot aquest sistema, que pot estar influenciat per multitud de factors genètics, metabòlics i ambientals. No obstant, el mètode de puntuació proposat permet diferenciar de manera evident les dues poblacions en funció del nivell de distrès oxidatiu i això el fa vàlid per ser utilitzat en altres patologies, en tractaments farmacològics i situacions fisiològiques.

Figura 20. Puntuació del distrès oxidatiu (PDO) en diferents situacions fisiològiques i patològiques en humans



Mitjanes i desviacions estàndard de la PDO en diferents situacions fisiològiques i patològiques. S'adjunta el nombre d'individus (n). * indica diferències significatives amb el grup control; # indica diferències significatives entre els grups marcats; NS indica que no hi ha diferències significatives.

Quan la població d'estudi té un número gran d'individus, com és el cas de la IR, l'embaràs i l'envelliment, l'anàlisi de la PDO i dels biomarcadors del distrès oxidatiu ha permès determinar més acuradament quin era l'estat real de la cèl·lula davant de les ERO i conèixer on es produeix el desequilibri amb més seguretat. Aquesta informació permetria plantejar, a nivell clínic, quina seria la teràpia antioxidant més adient per a cada individu o grup d'individus. En canvi, els estudis que es basen amb un sol paràmetre no poden concretar la causa del desequilibri que ha provocat la situació final d'estrès oxidatiu i, per tant, és faria més difícil determinar la manera de corregir el desequilibri.

L'estudi de la PDO en dones embarassades a les quals s'administrava un suplement de ferro ens proporciona un cas clar d'aplicabilitat del nostre mètode. Les dones embarassades tenien estrès oxidatiu de tipus secundari a la setmana 26 de gestació. Aquest fet era degut, probablement, al major consum d'oxigen, però l'estrès era molt més evident en les dones que no presentaven anèmia en aquesta fase de la gestació. Per tant, la PDO ha permès diferenciar dos grups de dones embarassades, segons si presentaven o no anèmia, i també ha permès posar en evidència les conseqüències de l'administració preventiva de ferro: el ferro impedeix que un 38 % de les dones embarassades presentin anèmia a la setmana 26 de gestació però, en canvi, facilita que aquestes dones tinguin una major PDO. Com que la dosi administrada en tota la població no presentava diferències en els dos subgrups pensem que, probablement, intervenen factors genètics de major absorció de ferro que permeten que algunes dones no presentin anèmia, però, potser l'excés de ferro és el responsable de major estrès oxidatiu.

Per això, es fa necessari estudiar quina és la dosi correcta a administrar segons els nivells d'absorció i/o tenir indicadors de seguiment del tractament de correcció de l'anèmia i aparició de l'estrès oxidatiu, com és la PDO, i així poder disminuir o augmentar la càrrega de ferro segons la resposta.

En la població d'estudiants, davant d'un estrès psicològic, com són els exàmens, no hi havia diferències en la PDO, no obstant, tots els biomarcadors, a excepció de la T-GST i la SOD, variaven significativament després dels exàmens. Aquest fet ens ratifica la importància d'estudiar una sèrie de paràmetres, ja que si s'hagués valorat l'estrès oxidatiu amb un sol biomarcador haguéssim arribat fàcilment a conclusions errònies i/o contradictòries, segons el paràmetre que s'hagués escollit. En canvi, la nostra proposta de puntuació té en compte les diferents respostes dels sistemes antioxidants, i el fet que la PDO no mostri diferències entre els estudiants abans i després dels exàmens probablement és degut que els canvis que es produeixen en els biomarcadors són conseqüència d'una adaptació o resposta secundària a l'estrès psicològic, és a dir a un re-equilibri. Per altra banda, de la mateixa manera que en la població d'embarassades, la PDO ens ha permès subdividir la població segons els hàbits de vida saludable i observar major estrès oxidatiu en aquells que havien fet canvis en els seus hàbits (figura 19B).

En les diferents situacions fisiològiques estudiades, a excepció de l'embaràs, hem observat que la PDO no era significativament diferent respecte el control, però l'anàlisi dels biomarcadors i els estudis de regressió lineal múltiple ens han permès observar que el grup de major edat (>65 anys) té mostres d'estrès oxidatiu, o, si més no, que en individus més grans els valors són diferents que en els joves però segueixen essent normals, com les TBARS plasmàtiques augmentades, i que el sexe influeix en la PDO.

En resum, l'estudi de la PDO pot ser útil per les següents raons:

1. Per informar de l'estat de la balança prooxidant-antioxidant.
2. Com una nova variable d'informació de grau d'estrès oxidatiu.
3. Per diferenciar poblacions segons tractament, segons hàbits i altres

L'anàlisi dels biomarcadors de manera individual en cada població d'estudi ens ha permès veure quins són els que aporten més informació. Hem estudiat biomarcadors de categories diferents segons Dotan i cols. (*Prog Lipid Res*, 2004): determinació d'inhibidors (antioxidants de baix pes molecular i enzims i macromolècules), determinació dels productes de la peroxidació lipídica i determinació de la susceptibilitat d'oxidació.

En totes les situacions estudiades hem trobat que els biomarcadors que presentaven diferències significatives estaven, segons la situació patològica o fisiològica en les quatre categories. El GSH, GSSG i el GSSG/GSH han estat els biomarcadors que més vegades han estat el fet diferencial per marcar el distrès oxidatiu. En la IR el GSSG eritrocitari augmenta un 90 % respecte a la població control i el GSSG/GSH eritrocitari augmenta un 147 %. En aquesta mateixa població i un cop han rebut tractament amb EPO, podem veure una certa recuperació d'un dels biomarcadors, el GSH, que augmenta un 19 % després de 6 mesos de tractament. En la sèpsia el GSH eritrocitari també disminueix un 32,5 % en la primera extracció, és a dir, a l'ingrés a la Unitat de Cures Intensives, i es manté durant tota l'estada, finalment, el GSSG/GSH augmenta de manera significativament a l'ingrés un 79 %.

En la IR, el GSH és un biomarcador important del distrès oxidatiu, i els resultats del GSH en plasma ens poden donar informació, tot i així, no creiem adient incloure'l en l'estudi de la PDO ja que hem trobat molts resultats contradictoris en la literatura. Per això, com ja s'ha comentat anteriorment, el GSH, GSSG i GSSG/GSH de plasma no s'han tingut en compte a l'hora de puntuar el distrès oxidatiu.

En l'envelliment, el GSH i el GSSG/GSH de l'eritròcit i el plasma juntament amb les TBARS plasmàtiques són els únics biomarcadors que indiquen l'existència de major oxidació en els individus de més de 65 anys respecte als altres grups d'edat. En l'eritròcit dels individus de més de 65 anys, el GSH disminueix significativament un 33 % respecte al grup d'edat de 50 a 65 anys, i en el plasma la disminució encara és més evident i és significativa respecte als dos grups d'edat restants, de l'ordre d'un 42 % menys. El mateix passa amb el GSSG/GSH que augmenta un 46 % en l'eritròcit respecte al grup d'edat de 50 a 65 anys i en el plasma l'augment és al voltant del 110 % respecte als dos grups d'edat anteriors.

Un altre població on el GSH ha estat el marcador del distrès oxidatiu ha estat durant l'embaràs on el GSH de l'eritròcit disminueix significativament un 34 % respecte a la població control i el GSSG i el GSSG/GSH augmenten un 57 % i 220 % respectivament.

Per determinar la peroxidació proteica, el més correcte seria poder tenir un biomarcador específic, no obstant Dotan i col·ls. presenten el GSSG com a biomarcador del dany oxidatiu a pèptids. Com ja hem comentat, el GSSG ha estat estudiat en aquest treball i és un dels biomarcadors, juntament amb el GSSG/GSH, que més informació de l'estat d'estrès oxidatiu ens ha proporcionat. A més, Griffiths i

col·ls. (*Molecular Aspects of Medicine, 2002*), que estudien quins són els biomarcadors més recomanables per l'estudi de l'estrès oxidatiu, presenta al GSSG com un bon biomarcador.

Dins els enzims i macromolècules inhibidors de la oxidació, hem vist diferències significatives en tots els biomarcadors estudiats, però el que més vegades s'ha repetit en la significació estadística ha estat la GR. Hem vist variacions en els dos sentits: en la IR i en l'estrès psicològic ha augmentat significativament un 21,6 % i un 30 % respectivament; i en l'MPOC ha disminuït significativament un 29,7 % respecte al control. També ha estat un biomarcador diferent significativament en l'estudi segons sexe, on hem vist que la dona té un 17 % més d'activitat enzimàtica.

La GST també ha estat un dels biomarcadors que més informació ha donat, sobretot gràcies a l'estudi de la fracció termoestable, que ens permet veure l'estabilitat de l'enzim. En la IR, hem observat que la T-GST ha augmentat significativament respecte al control un 51 %, però la R-GST ha disminuït un 26 %. En els altres grups on hi ha hagut significació en la GST, les variacions sempre han estat respecte la pèrdua d'estabilitat de l'enzim, no hi havia augment de l'activitat total però sí una disminució de l'activitat termoestable. Aquest fet s'ha pogut veure amb les modificacions significatives de la TS-GST i R-GST en la sèpsia, l'IAM i l'embaràs. També ha estat un dels biomarcadors que han variat en l'estudi de la població segons el sexe, on les dones tenen un 48,5 % més d'activitat termoestable de la GST.

En l'estudi dels productes de peroxidació, les TBARS han estat significatives com a indicadores d'estrès oxidatiu tan sols en el plasma del grup d'edat major de 65 anys, on augmentaven un 46 % respecte el primer grup d'edat. En els eritròcits, han variat significativament però en sentit contrari, es a dir, els valors de les TBARS en l'MPOC, la sèpsia i l'IAM eren inferiors que els obtinguts a la població control. En l'apartat de resultats ja n'hem discutit les possibles causes però pensem que els valors obtinguts en aquest biomarcador tenen una utilitat dubtosa, almenys en les patologies que hem estudiat fins al moment. En tot cas, quan parlem de productes de peroxidació dins la PDO, el criteri que hem utilitzat ha estat el de donar un punt positiu, com indicador d'estrès oxidatiu, quan sempre que el valor obtingut sigui superior als valors control, i no donar cap puntuació en les altres situacions, per tant, el fet que els valors siguin més baixos no serà indicatiu d'estat antioxidant.

Per mesurar la capacitat oxidativa hem utilitzat el test d'hemòlisi. En l'estudi de les diferents situacions fisiològiques o patològiques ens ha permès veure que hi havia senyals d'estrès oxidatiu per aquest paràmetre en la IR, on augmentava un 30 % respecte a la població control, en canvi, inexplicablement, l'hemòlisi ha disminuït significativament en la MPOC i la sèpsia. Tot i que no entenem el perquè d'aquesta disminució, pensem que l'hemòlisi és un altre biomarcador que s'ha de categoritzar i donar puntuació positiva tan sols quan sigui indicador d'estrès oxidatiu, és a dir, si el valor obtingut sobrepassa el límit superior dels valors de referència tindrà un punt positiu, però valors baixos no tenen perquè indicar un estat antioxidant. D'aquesta manera, a l'aplicar la PDO en una situació en la que la susceptibilitat d'oxidació sigui elevada, podem representar aquest factor de risc augmentant un punt la PDO.

En l'últim objectiu del treball hem comparat dues puntuacions, la proposada per nosaltres i la derivada de la prova dels discriminants, i hem vist que no mostren diferències significatives en la població renal, no obstant, no és possible utilitzar indistintament un dels dos mètodes, el proposat per nosaltres o el que ens proporciona la prova dels discriminants, ja que la prova dels discriminants té el clar desavantatge que només és aplicable a grups tancats d'individus, si volem afegir un nou individu al grup, els resultats dels discriminants varien. En canvi, el mètode de puntuació que nosaltres hem proposat permet establir el grau de distrès oxidatiu en qualsevol situació i de manera individual per a cada cas.

En l'anàlisi dels discriminants de tots els grups estudiats hem observat que els biomarcadors inclosos en aquest treball serveixen per diferenciar el grup d'estudi i el del control i també permeten diferenciar grups definits com en el cas de l'edat, anèmia o no anèmia, abans o després d'exàmens, gènere, tractament amb EPO o no. Però, encara que aquest test estadístic separi correctament els grups, no podem afirmar que aquesta diferència és deguda a un estrès oxidatiu o a un estat antioxidant. El cas més clar és el de l'estudi de l'estrès psicològic. Per diferenciar els estudiants abans i després dels exàmens, el test utilitza un nombre important de biomarcadors i classifica correctament un 97 % dels joves abans dels exàmens i un 100 % després. Aquest resultat ens podria fer pensar que un dels grups, abans o després dels exàmens, té un estrès oxidatiu molt més elevat que l'altre, en canvi, amb la PDO hem vist que no hi ha estrès oxidatiu i que els canvis que es produeixen en els sistemes antioxidants són el resultat de processos d'adaptació, i la balança prooxidant-antioxidant es manté igual abans i després dels exàmens. Així, per una banda, els discriminants no permeten saber quin és el grup que té més o menys estrès oxidatiu, però per l'altra separa dues poblacions molt millor que la PDO, utilitzant els mateixos biomarcadors.

En definitiva, pensem que el nostre treball ens permet afirmar que, en un futur, quan es vulgui determinar la relació dels RLLO amb diferents situacions patològiques o fins i tot fisiològiques, com en l'envelliment, no ens podem quedar centrats en determinar només l'augment de la producció dels RLLO, o només la resposta antioxidant, sinó que hem de valorar de manera global l'estat d'equilibri entre la formació de RLLO i els sistemes defensius, és a dir, el grau de distrès oxidatiu. La nostra bateria de proves permet obtenir una nova variable, la PDO, que té un alt grau d'aplicabilitat clínica, ja que són proves que parteixen d'una mostra de sang venosa, de fàcil obtenció, i d'uns requeriments tècnics no molt sofisticats. No obstant, pensem que s'hauria de definir clarament **On? Quan? Què? i Com?** fer els estudis d'estrès oxidatiu per obtenir una valoració global com la nostra PDO.

A partir d'aquest treball i tenint en compte la bibliografia mostrada en aquesta tesi, especialment els treballs de Dotan i col·ls. i Griffiths i col·ls., proposem els següents criteris a tenir en compte per realitzar, en el futur, estudis de distrès oxidatiu (*Prog Lipid Res*, 2004; *Molecular Aspects of Medicine*, 2002):

- **On?:** en eritròcits i plasma de manera preferent, per la facilitat d'obtenció de les mostres i en orina per algun biomarcador concret, com per exemple els metabòlits dels isoprostans.
- **Quan?:** sempre en dejú, al matí i registrar els factors d'exposició a les ERO en cada individu.

- **Què?:** la PDO tal i com s'ha fet en aquest treball però, a més, tenint en compte totes les categories que apareixen a la figura 6; és a dir, ampliar la bateria d'indicadors amb el dany al DNA i el dany a proteïnes. Estudiar també un biomarcador de capacitat antioxidant total, però sense incloure'l a la PDO ja que ens proporcionaria informació sobre l'estat dels sistemes antioxidants d'una manera global, igual que la PDO, Si la correlació entre la PDO i aquest paràmetre de capacitat antioxidant total és bona, es podria usar per fer el seguiment de l'estat oxidatiu d'un individu al llarg del temps o, per exemple, per controlar el seu estat durant una teràpia antioxidant. Segons Griffiths, el millor biomarcador d'aquesta categoria és l'ORAC.
- **Com?:** Aplicar sempre els mateixos criteris de puntuació per valorar els diferents biomarcadors. El següent esquema resumeix l'assignació de punts en cada una de les possibles situacions en les que es pot trobar un biomarcador del distrès oxidatiu:

-1 (ANTIOXIDANT)

- Tots els **enzims i macromolècules inhibidores de l'estrès oxidatiu** alts, EXCEPTE :
 - Situacions que mostrin adaptació a un estat oxidatiu
 - SOD com enzim oxidant (alta)
 - GPx com enzim de segona línia
- **Inhibidors de baix pes molecular** alts: GSH com antioxidant

0 (EQUILIBRI)

- Normalitat
- SOD baixa
- Productes de peroxidació baixos
- Susceptibilitat d'oxidació baixa

+1 (ESTAT OXIDATIU)

- **Productes de peroxidació** alts
- Tots els **enzims i macromolècules inhibidors de l'estrès oxidatiu** baixos EXCEPTE:
 - GPx, enzim de segona línia
- SOD baixa amb altres signes d'oxidació
- **Susceptibilitat d'oxidació** alta

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. S'han establert els rangs de normalitat dels biomarcadors del distrès oxidatiu, que són necessaris per valorar l'estat de la balança prooxidant-antioxidant en qualsevol situació fisiològica o patològica. Aquests valors normals s'han d'obtenir en controls: no exposats a fonts exògenes d'ERO i sense malaltia.

2. En individus control, la Puntuació del Distrès Oxidatiu (PDO) es situa al voltant de zero punts, i en individus amb estrès oxidatiu, la PDO és superior a zero punts.

3. Segons la PDO, els pacients amb IR no sotmesos a diàlisi tenen estrès oxidatiu, independentment de la etiologia de la IR, i aquest estrès es manté després de sis mesos de tractament amb EPO. També tenen estrès oxidatiu els pacients amb MPOC. En la sèpsia i l'IAM l'estrès oxidatiu apareix en el moment de l'ingrés hospitalari però no a les 24 i 48 hores, ni en el moment de l'alta.

4. La PDO es manté al voltant de zero punts en homes i dones sans de tots els rangs d'edat. Les dones embarassades que prenen ferro tenen estrès oxidatiu a les 26 setmanes de gestació, i aquest estrès oxidatiu és més elevat en les embarassades que no tenen anèmia, probablement a causa d'una sobrecàrrega de ferro. Els estudiants universitaris obtenen una PDO superior a zero tant abans com després d'una situació d'estrès psicològic com són els exàmens universitaris, no obstant, l'estrès oxidatiu després dels exàmens és superior en els estudiants que no tenen hàbits de vida saludables.

5. La informació obtinguda a partir de la PDO és més acurada que la que s'obté amb cada un dels biomarcadors estudiats de manera individual i representa amb més exactitud l'estat de la balança prooxidant-antioxidant de l'individu.

6. Els biomarcadors que marquen d'una manera més clara l'estrès oxidatiu són els que es relacionen amb el sistema glutatió (GSH, GSSG, GSSG/GSH en eritròcits i plasma i T-GST, TS-GST i R-GST en eritròcits). Aquests biomarcadors indiquen estrès oxidatiu en la IR, la sèpsia, la vellesa i l'embaràs.

7. L'enzim antioxidant que més informació ens dona és la GR i l'enzim que menys varia, sigui quina sigui la situació de l'individu, és la CAT.

8. Les TBARS i el test d'hemòlisi han variat significativament. Amb l'edat, les TBARS augmenten, segons el gènere, les dones tenen més TBARS, i en els pacients amb IR, el test d'hemòlisi és més alt que en els controls. En altres situacions, com la MPOC o la sèpsia, els resultats de les TBARS en l'eritròcit són menors que els del grup control, no obstant, tots els valors es mantenen dins els rangs de normalitat.

9. El test dels discriminants permet separar correctament els individus en grups utilitzant els paràmetres lligats al distrès oxidatiu i ens dona una idea dels biomarcadors que més s'alteren estadísticament en cada situació estudiada. No obstant, és incapaç d'indicar quin dels grups té més estrès oxidatiu i quin és el grau d'estrès en cada individu. D'altra banda, no permet obtenir en un moment concret la puntuació d'estrès oxidatiu d'un sol individu.

10. La PDO és un possible paràmetre clínic a tenir en compte a l'hora d'avaluar l'estrès oxidatiu de manera rutinària i individual, la seva aplicació és possible tant en el context de la malaltia com per al control d'altres situacions, com ara els efectes d'una vida no saludable. En tots dos casos, la informació que ens aporta el nostre mètode obre la porta a una possible prescripció de teràpia antioxidant, ja sigui de tipus farmacològica o dietètica.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 2001; 306(1-2):1-17.
- Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta* 2004; 349(1-2):97-103.
- Adang AEP, Brussee J, Van der Gen A, Mulder GJ. The glutathione-binding site in glutathione S-transferases. Investigation of the cysteinyl, glycyI and g-glutamyl domains. *Biochem J* 1990; 269(1): 47-54.
- Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(3): 463-499.
- Anderson KM, Ells G, Bonomi P, Harris JE. Free radical spin traps as adjuncts for the prevention and treatment of disease. *Med Hypotheses* 1999; 52(1):53-57.
- Arguelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta* 2004; 1674(3):251-259.
- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JM. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 1989; 258(2):617-620.
- Ashcroft GS, Kielty CM, Horan MA, Ferguson MW. Age-related changes in the temporal and spatial distributions of fibrillin and elastin mRNAs and proteins in acute cutaneous wounds of healthy humans. *J Pathol* 1997; 183(1):80-89.
- Axelrod M, Serafin D, Klizman B. Ultraviolet light and free radicals: an immunologic theory of epidermal carcinogenesis. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86 (3): 582-593.
- Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg* 1985; 202(5):628-641.
- Banni S, Lucchi L, Baraldi A, Botti B, Cappelli G, Corongiu F, Dessi MA, Tomasi A, Lusvarghi E. No direct evidence of increased lipid peroxidation in

- hemodialysis patients. *Nephron* 1996; 72(2):177-183.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 1993; 14(6):615-631.
- Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy. *Clin Biochem* 2005; 38(1):13-18.
- Bela P, Bahl R, Sane AS, Sawant PH, Shah VR, Mishra VV, Trivedi HL. Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients. *Panminerva Med* 2001; 43 (1): 27-31.
- Benzie IF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 136(1):113-126.
- Berez V, Camps J, Arija V, Aranda N, Fernandez-Ballart J, Vilella E, Figuera L, Ferre N, Joven J. Soluble transferrin receptor and mutations in hemochromatosis and transferrin genes in a general Catalan population. *Clin Chim Acta* 2005; 353(1-2):205-208.
- Bishop C, Hudson VM, Hilton SC, Wilde C. A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. *Chest* 2005;127(1):308-17.
- Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* 2005; 46(1)85-95.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- Buoncristiani U, Galli F, Rovidati S, Albertini MC, Campus G, Canestrari F. Oxidative damage during hemodialysis using a vitamin-E-modified dialysis membrane: a preliminary characterization. *Nephron* 1997; 77(1):57-61.
- Bureau A, Lahet JJ, Lenfant F, Bouyer F, Petitjean M, Chaillot B, Freysz M. Optimization of a model of red blood cells for the study of anti-oxidant drugs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7):341-344.
- Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(5):1081-1087.

- Cathcart R, Schwieters E, Saul RL, Ames BN. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(18):5633-5637.
- Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(6):845-853.
- Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003; 26(5):1589-1596.
- Chalmers AH, Blake-Mortimer JS, Winefield AH. The prooxidant state and psychologic stress. *Environ Health Perspect* 2003; 111(1):A16.
- Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 1979; 29: 175-274.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 481-493.
- Cheng Z, Yan G, Li Y, Chang W. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. *Anal Bioanal Chem* 2003; 375(3):376-380.
- Churg A. Interactions of exogenous or evoked agents and particles: the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(10):1230-1235.
- Clements JE, Anderson BB. Glutathione reductase activity and pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase activity in the red cell. *Biochim Biophys Acta* 1980; 632(2):159-163.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970; 34: 30-38.
- Corradi M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Cuomo A. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003; 8(1):26-30.
- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadreja D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in

- antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(7):785-792.
- Dajas F, Ferrari A, Martínez A, Zeppi M, Ferreira BM, Pintos A. *Rev Med Uruguay* 2004; 20: 12-18.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329(1-2): 23-38.
- Dansen TB, Wirtz KW. The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 2001; 51 (4): 223-230.
- Day BJ. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov Today* 2004; 9(13):557-566.
- De la Asuncion JG, Millan A, Pla R, Bruseghini L, Esteras A, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10(2): 333-338.
- De Paulet AC, de Paulet PC, Thaler-Dao. Analysis and quantitative determination of plasma phospholipids by thin layer chromatography and "indirect" photodensitometry. *Ann Biol Clin* 1967; 25(5):627-644.
- De Paulet AC. Free radicals and aging. *Ann Biol Clin* 1990; 48(5):323-330.
- Deleve LD, Kaplowitz N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 1990; 10 (4): 251-266.
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3):200-227.
- Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(10):1009-13.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989; 6(1):67-75.
- Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr* 2000; 112 (14): 610-616.
- Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(6):667-682.
- Fandrey J, Frede S, Jelkmann W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem J*.1994; 303 (Pt 2):507-10.

- Fano G, Mecocci P, Vecchiet J, Belia S, Fulle S, Polidori MC, Felzani G, Senin U, Vecchiet L, Beal MF. Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2001; 22(4):345-51.
- Farrell PM, Bieri JG, Fratantoni JF, Wood RE, di Sant'Agnese PA. The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1977; 60(1):233-241.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
- Fulbert JC, Cals MJ. Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol Biol (Paris)* 1992; 40(1):66-77.
- Galli F, Rovidati S, Benedetti S, Buoncristiani U, Covarelli C, Floridi A, Canestrari F. Overexpression of erythrocyte glutathione S-transferase in uremia and dialysis. *Clin Chem* 1999; 45(10):1781-1788. Erratum a: *Clin Chem* 1999; 45(12):2298.
- Giralt M, Cervello I, Nogues MR, Puerto AM, Ortin F, Argany N, Mallol J. Glutathione, glutathione S-transferase and reactive oxygen species of human scalp sebaceous glands in male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 1996; 107(2):154-158.
- Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. En: Bergmeyer HU eds. *Methods of enzymatic analysis 3rd ed.* 1983:258-265.
- Goth L. A new type of inherited catalase deficiencies: its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27(2):512-517.
- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002; 23(1-3):101-208.
- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg AM, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhagen H, Astley SB. Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002; 23(1-3):101-208.
- Grune T, Sommerburg O, Siems WG. Oxidative stress in anemia. *Clin Nephrol* 2000; 53: S18-S22.
- Guerra LN, Moiguer S, Karner M, de Molina MC, Sreider CM, Burdman JA. Antioxidants in

- the treatment of Graves disease. *IUBMB Life* 2001; 51(2):105-109.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280(1):1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press, New York* 1989; 543.
- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path* 1989; 70: 737-757.
- Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free Radic Biol Med* 1989; 7(6):645-651.
- Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000; 72(5):1082-1087.
- Harley CB, Homayoun V, Christopher M, Counter R, Allsopp C. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27:375-382.
- Harman D. Free-Radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 717: 1-15.
- Hazelton GA, Lang CA. Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem J* 1980; 188(1):25-30.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(10): 1456-1462.
- Herrera J, Nava M, Romero F, Rodríguez-Iturbe B. Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *Am J Kidney Dis* 2001; 37 (4): 750-757.
- Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 2002; 22(6):RC215.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74: 214-226.
- Hseu YC, Chang WC, Yang HL. Inhibition of human plasmin activity using humic acids

- with arsenic. *Sci Total Environ* 2001 12; 273(1-3):93-99.
- Junod AF. Oxygen free radicals and lungs. *Intensive Care Med* 1989; 15: S21-S23.
- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004; 25(1-2): 5-16.
- Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006; 187(1):1-17.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; 25: 317-364.
- Kasapoglu M, Ozben T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(2): 209-220.
- Kiely M, Flynn A, Harrington KE, Robson PJ, O'Connor N, Hannon EM, O'Brien MM, Bell S, Strain JJ. The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutr* 2001; 4(5A):1089-1097.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30(6):620-650.
- Kosugi H, Enomoto H, Ishizuka Y, Kikugawa K. Variations in the level of urinary thiobarbituric acid reactant in healthy humans under different physiological conditions. *Biol Pharm Bull* 1994; 17(12): 1645-1650.
- Kristal BS, Yu BP. An emerging hypothesis synergistic induction of aging by free radicals and maillard reactions. *J Gerontol* 1992; 47(4):B107-114.
- Lachili B, Hininger I, Faure H, Arnaud J, Richard MJ, Favier A, Roussel AM. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biol Trace Elem Res* 2001;83(2):103-110.
- Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W, Liu MC. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med* 2000; 135(5):402-405.
- Lawler JM, Song W. Specificity of antioxidant enzyme inhibition in skeletal muscle to reactive nitrogen species donors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(5):1093-1100.

- Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109(4):315-323.
- Lesgards JF, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, Prost M, Lehucher-Michel MP. Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ Health Perspect* 2002; 110(5):479-486.
- Lewis GR. Should doctors discourage nutritional supplementation? A cardiovascular perspective. *Heart Lung Circ* 2004; 13(3):245-251.
- Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G. Panax ginseng administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med* 1999; 65 (7): 614-619.
- Makinodan T, Kay MMB. Age influence on the immune system. *Adv Immunol* 1980; 29:287.
- Marra G, Cotroneo P, Pitocco D, Manto A, Di Leo MA, Ruotolo V, Caputo S, Giardina B, Ghirlanda G, Santini SA. Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes: a case for gender difference. *Diabetes Care* 2002; 25(2):370-375.
- Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192(1): 1-15.
- Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. *Biochem J* 1986; 236:397-400.
- McArdle F, Rhodes LE, Parslew R, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(10):1355-1362.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein. *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.
- Mendoza-Nunez VM, Sanchez-Rodriguez MA, Retana-Ugalde R, Vargas-Guadarrama LA, Altamirano-Lozano MA. Total antioxidant levels, gender, and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Ageing Dev* 2001; 122(8):835-47.
- Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, Peus D. Vitamin C derivative ascorbyl palmitate promotes ultraviolet-B-induced

- lipid peroxidation and cytotoxicity in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2002; 119(5):1103-1108.
- Mimic-Oka J, Djukanovic L, Markovic B. Erythrocyte and plasma glutathione levels in patients with chronic renal insufficiency. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 39(1):48-54.
- Minotti G, Aust SD. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 1992; 27(3):219-26.
- Minotti G, Aust SD. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44(2-4):191-208.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 1996; 102(1):17-36.
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18(15):1791-800.
- Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31(4):1048-1052.
- Mukhopadhyay A, Bhatla N, Kriplani A, Pandey RM, Saxena R. Daily versus intermittent iron supplementation in pregnant women: hematological and pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30(6):409-417.
- Mulero M, Romeu M, Giralt M, Folch J, Nogués MR, Fortuño A, Sureda FX, Linares V, Cabré M, Paternáin JL, Mallol J. Oxidative stress-related markers and Langerhans cells in a hairless rat model exposed to UV radiation. *J Toxicol Environ Health A* 2006; 69(14):1371-1385.
- Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 2001; 55(4):236-248.
- Nemeth I, Turi S, Haszon I, Bereczki C. Vitamin E alleviates the oxidative stress of erythropoietin in uremic children on hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(1):13-17.

- Nogues MR, Giralt M, Cervello I, Del Castillo D, Espeso O, Argany N, Aliaga A, Mallol J. Parameters related to oxygen free radicals in human skin: a study comparing healthy epidermis and skin cancer tissue. *J Invest Dermatol* 2002; 119(3):645-652.
- Nourooz-Zadeh J. Effect of dialysis on oxidative stress in uraemia. *Redox Rep.* 1999; 4(1-2):17-22.
- Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Yoshioka Y, Mitsuzono R, Migita T, Sumida S, Sugawa-Katayama Y. Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans. *Free Radic Res* 1997; 26(6):507-514.
- Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. A correction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 76:1476.
- Pré J. La lipoperoxydation. *Pathol Biol* 1991; 39 (7): 716-736.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* 2003; 51(11):3273-3279.
- Rabini RA, Moretti N, Staffolani R, Salvolini E, Nanetti L, Franceschi C, Mazzanti L. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. *Exp Gerontol* 2002; 37(5): 657-663.
- Reece EA, Homko CJ, Wu YK, Wiznitzer A. The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations. *J Soc Gynecol Investig* 1998; 5(4):178-87.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34(2):237-256.
- Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 1992; 38: 704-709.
- Rivera MT, de Souza AP, Moreno AH, Xavier SS, Gomes JA, Rocha MO, Correa-Oliveira R, Neve J, Vanderpas J, Araujo-Jorge TC. Progressive Chagas' cardiomyopathy is associated with low selenium levels. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66(6): 706-712.

- Rodrigo R, Parra M, Bosco C, Fernandez V, Barja P, Guajardo J, Messina R. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacol Ther* 2005; 107(2):177-197.
- Roginsky V, Alegria AE. Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *J Agric Food Chem* 2005; 53(11):4529-4535.
- Romero Alvira D, Villalba Martin MP, Mur Villacampa M, Cabeza Lamban F, Guerrero Navarro L, Simal Gil E. The importance of anti-oxidants in human nutrition. *Med Clin* 1990; 94(2):69-75.
- Romeu M, Mulero M, Giralt M, Folch J, Nogues MR, Torres A, Fortuno A, Sureda FX, Cabre M, Paternain JL, Mallol J. Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat. *Life Sci* 2002; 71(15): 1739-1749.
- Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol*. 1992;22(2):119-141.
- Salamunic I, Juretic D, Ljutic D. Effect of different dialysis membranes on erythrocyte antioxidant enzyme levels and scavenger systems related to free hemoglobin in serum of hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(7):904-907.
- Scholl TO. Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81(5):1218S-1222S.
- Sheldrake AR. The ageing, growth, and death of cells. *Nature* 1974; 250:381-385.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91 (suppl 3C): 343-350.
- Singh R, Singh RK, Tripathi AK, Cornelissen G, Schwartzkopff O, Otsuka K, Halberg F. Chronomics of circulating plasma lipid peroxides and anti-oxidant enzymes and other related molecules in cirrhosis of liver. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 1:S229-235.
- Sivonova M, Zitnanova I, Hlincikova L, Skodacek I, Trebaticka J, Durackova Z. Oxidative stress in university students during examinations. *Stress* 2004; 7(3): 183-188.
- Slagboom PE, Vug J. Genetic instability and aging: theories, facts, and future perspectives. *Genome* 1989; 31:373-85.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(5):575-586.

- Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis* 2001; 22(1):67-72.
- Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis* 2001; 22(1):67-72.
- Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad.Sci* 2000; 899:191-208.
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266(4): 2005-2008.
- Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928:22-38.
- Stenberg G, Board PG, Carlberg I, Mannervik B. Effects of directed mutagenesis on conserved arginine residues in a human class alpha Glutathione Transferase. *Biochem J* 1991; 274: 549-555.
- Suliman HB, Ali M, Piantadosi CA. Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia. *Blood* 2004; 104(1):43-50.
- Sverko V, Sobocanec S, Balog T, Marotti T. Age and gender differences in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice. *Biogerontology* 2004; 5(4):235-242.
- Szilard L. On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959;45:30-45.
- Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(4):327-340.
- Thannickal VJ. The paradox of reactive oxygen species: injury, signaling, or both?. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(1):L24-25.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 2005; 39(2):99-104.
- Trznadel K, Luciak M, Pawlicki L, Kedziora J, Blaszczyk J, Buczynski A. Superoxide anion generation and lipid peroxidation processes during hemodialysis with

- reused cuprophane dialyzers. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(5):429-432.
- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4(3):405-414.
- Upadhyaya C, Mishra S, Singh PP, Sharma P. Antioxidant status and peroxidative stress in mother and newborn – a pilot study. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20(1):30-34.
- Urban T, Hurbain I, Urban M, Clément A, Housset B. Oxydants et antioxydants. Effets biologiques et perspectives thérapeutiques. *Ann Chir* 1995; 49(5):427-434.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 1982; 710:197-211.
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5(2):145-152.
- Van Kuijk FJ, Sevanian A, Handelman GJ, Dratz EA. A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochem Sci* 1987; 12(1): 31-34.
- Vaya J, Aviram M. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Curr Med Chem - Imm, Endoc & Metab Agents* 2001; 1(1):99-117.
- Vaya J, Tamir S. The relation between the chemical structure of flavonoids and their estrogen-like activities. *Curr Med Chem* 2004; 11(10):1333-1343.
- Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003; 63(1):179-185.
- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(3):327-347.
- Westhuyzen J, Adams CE, Fleming SJ. Evidence for oxidative stress during in vitro dialysis. *Nephron* 1995; 70(1):49-54.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for

superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 1990; 184: 193-199.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339(1-2):1-9.

Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(Pt 2):358-362.

Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(5):321-329.

PUBLICACIONS PRÒPIES

ARTICLES I CAPÍTOLS DE LLIBRE

Romeu, M.; Mulero, M.; Giralt, M.; Folch, J.; Nogués, M.R.; Torres, A.; Fortuño, A.; Sureda, FX.; Cabre, M.; Paternáin, JL.; Mallol, J. Parameters related to oxygen free radicals in erythrocytes, plasma and epidermis of the hairless rat. *Life Sciences* 2002; 71: 1739-1749.

Mallol J, Giralt M, Nogués M R, Sureda FX, Romeu M, Mulero M. Concepto y valoración del estrés oxidativo. En: Salvador-Carulla, Cano Sánchez, Cabo-Soler. Longevidad. Tratado Integral sobre salud en la segunda mitad de vida. *Buenos Aires- Madrid: Médica Panamericana; 2004. p. 86-95.*

COMUNICACIONS A CONGRESSOS

Romeu, M.; Mulero, M.; Nogués, M.R.; Giralt, M.; Mateo, JM.; Mallol, J. Markers of the balance between production and defence of oxygen free radicals (OFR) in human blood. Oxidative distress valoration. XXIV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Toledo, 2002. *Meth Find Exp Clinl Pharmacol* 2002; 24: 133.

Romeu M, Giralt M, Mulero M, Nogués MR, Sánchez-Martos V, Mallol J. Influencia de la edad y el sexo en el distrés oxidativo de una población sana. Andalucía Longevity Forum. Antequera, desembre 2003. Llibre de Resums: 32. Premi al millor pòster del fòrum.

Romeu M, Mulero M, Nogués MR, Giralt M, Marcas LI, Mallol J. Estrés oxidativo en pacientes con insuficiencia renal. Efecto del tratamiento con eritropoyetina

(EPO). XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología. Cádiz, octubre 2003. *Meth Find Exp Clinl Pharmacol 2003; 25: 164.*

Giralt M, Nogués MR, Romeu M, Mulero M, Sánchez-Martos V, Mallol J. Clinical applications of a scoring system for evaluating oxidative stress in humans. 2nd Spanish and Portuguese Congress on Free Radicals. Leioa- Bizkaia. Noviembre 2004. Llibre de Resums: 106.

Giralt M, Romeu M, Mulero M, Nogués MR, Mallol J. Valoración analítica del estrés oxidativo en humanos. Aplicaciones clínicas. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Lleida. Setembre 2004. Llibre de Resums.

Romeu M, Mulero M, Nogués MR, Giralt M, Marcas LI, Mallol J. Effects of erythropoetin (EPO) treatment on oxidative stress in patients with renal impairment. XXVI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Salamanca. Setembre 2004. *Meth Find Exp Clinl Pharmacol 2004; 26: 148.*

Romeu M, Sánchez-Martos V, Trefler S, Recasens M, Álvarez G, Giralt M. Influence of daily habits on the oxidative stress (OS) in university students: The weight of exams. XXVII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología. Girona. Setembre 2005. *Meth Find Exp Clinl Pharmacol 27: 112.*

Romeu M, Aranda N, Arija V, Cavallé P, Viteri F, Giralt M. Iron supplementation and oxidative stress in pregnant women. Congrès: Nutrition 2006 - I World Congress of Public Health Nutrition - VII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Setembre 2006. Comunicació oral.

Aranda N, Fernandez-Ballart J, Murphy MM, Giralt M, Romeu M, Arijia V. Estado de hierro y estrés oxidativo en una población mediterránea. Congr s: Nutrition 2006 - I World Congress of Public Health Nutrition - VII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Setembre 2006. P ster.

ABREVIATURES

%	Percentatge
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxil
μl	microlitres
μmols	micromols
$^1\text{O}_2$	Oxigen singlet
8-OH-dG	8-hidroxi-deoxi-guanosina
AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropà
ATP	Adenosintrifosfat
CAT	Catalasa
CDNB	1-clor-2,4-dinitrobenzè
Cl^-	Anió clorur
Coef	Coeficient
Cu^+	Ió coure (I)
Cu^{2+}	Ió coure (II)
CuZn SOD	Superòxid dismutasa courezinc
D.O.	Densitat òptica
DNA	Àcid desoxirribonucleic
EC SOD	Superòxid dismutasa extracel·lular
EDTA	Àcid etildiaminotetracètic
EPO	Eritropoetina
erit.	Eritròcit
ERO	Espècies reactives d'oxigen
ESR	Espectroscopia de ressonància d'spin electrònic

Etc	Etcètera
Fe SOD	Superòxid dismutasa ferro
Fe ²⁺	Ió ferrós
Fe ³⁺	Ió fèrric
FRAP	Capacitat antioxidant per reduir l'ió fèrric
G6PDH	Glucosa 6 fosfat deshidrogenasa
GPx	Glutatió peroxidasa
GR	Glutatió reductasa
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
GSSG/GSH	Ràtio entre el glutatió oxidat i el reduït
GST	Glutatió S-transferasa
H [•]	Àtom d'hidrogen
H ₂ O [•]	Radical perhidroxil
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
Hb	Hemoglobina
HCl	Àcid clorhídric
HE	Hemòlisi
HO ₂ ⁻	Radical perhidroxil
HOCl	Àcid hipoclorós
HOONO	Peroxinitrit
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
I ₅₀	Concentració inhibidora 50.

IAM	Infart agut de miocardi
IR	Insuficiència renal
$K_2 HPO_4$	Fosfat àcid de potassi
KCl	Clorur de potassi
Kda	Kilodaltons
KH_2PO_4	Fosfat diàcid de potassi
L-OH	Hidròxids fosfolipídics
LOO [•]	Alquilperoxil fosfolipídic, radical lipoperòxid
L-OOH	Hidroperòxids fosfolipídics, peròxids lipídics
MDA	Malondialdehid
min	Minuts
ml	Mil·lilitre
mM	Mil·limolar
mmol	Mil·limols
Mn SOD	Superòxid dismutasa Manganès
MPO	Mieloperoxidasa
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
N	Grandària de la població
Na_2CO_3	Carbonat sòdic
Na_2HPO_4	Fosfat àcid de sodi
NaCl	Clorur de sodi
NAD	Dinucleòtid d'adenina i de nicotinamida
NADP ⁺	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina

NADPH	Fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NaH_2PO_4	Fosfat diàcid de sodi
NaHCO_3	Sodi Hidrogen Carbonat
NaOH	Hidròxid sòdic
NEM	N-etil-maleïmida
nm	Nanòmetres
nmol	Nanomols
NO	Monòxid de nitrogen
NO^\bullet	Radical de l'òxid nítric
NO_2	Diòxid de nitrogen
NO_x	Molècules d'oxigen nitrogenades
NS	No significatiu
O_2	Oxigen
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anió superòxid
$^\circ\text{C}$	Graus centígrads
OH^-	Anió hidroxil
OONO^-	Anió peroxinitrit
OPT	O-phtalaldehid
ORAC	Capacitat d'absorció dels radicals lliures
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDO	Puntuació de distrès oxidatiu
pH	Potencial Hidrogen

pl.	Plasma
PM	Pes molecular
PQ ⁺	Forma radicalar catiònica del ió Paraquat
PQ ⁺⁺	Ió Paraquat
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
Quoc	Quocient
REDOX	Reducció oxidació
Ref.	Referència
R-GST	Glutatió S-transferasa residual
RLL	Radical lliure
RLLO	Radical lliure d'oxigen
RNA	Àcid ribonucleic
RO	Carbonil excitat
RO [•]	Radical alcoxi
RO*	= RO
ROH	Una molècula d'hidròxid
ROH [•]	Radical hidroxilat
ROO [•]	Radical peroxil
ROOH	Una molècula d'un peròxid
S	Significatiu
s	segons
S.P.S.S.	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
-SH	Grup tiol

SIDA	Síndrome de la immunodeficiència adquirida
SOD	Superòxid dismutasa
TBA	Àcid tiobarbitúric
TBARS	<i>Tiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	Àcid tricloracètic
TEAC	Capacitat antioxidant equivalent al trolox
T-GST	Glutatió S-transferasa total
TRAP	Capacitat antioxidant d'atrapament de radicals totals
TS-GST	Glutatió S-transferasa termoestable
U	Unitats
UV	Ultraviolat
v.	versió