
ARTÍCULOS ORIGINALES

Marcadores de estrés oxidativo en pacientes cubanos con fenotipo clínico compatible con la fase I del xeroderma pigmentoso.

Oxidative stress markers in Cuban patients having a phase I-compatible clinical phenotype of xeroderma pigmentosum.

Tatiana Acosta Sánchez,^I Gretel Riverón Forment,^{II} Erick W. Hernández Rodríguez,^{III} Olivia Martínez Bonne,^{IV} Araceli Lantigua Cruz.^V

Resumen

El xeroderma pigmentoso es una genodermatosis causada por defectos en la reparación de daño al ADN. Existen evidencias científicas que demuestran la asociación entre las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad y los eventos relacionados con el estrés oxidativo. Se evaluó el comportamiento de marcadores de daño oxidativo y defensa antioxidante a nivel sistémico en 23 pacientes cubanos con fenotipo clínico compatible con la fase I del xeroderma pigmentoso y en 66 individuos aparentemente sanos como controles. Se midieron las concentraciones plasmáticas de malonildialdehído, productos avanzados de la oxidación de proteínas y grupos tioles libres, así como las actividades enzimáticas específicas de Cu/Zn superóxido dismutasa y la catalasa, en todos los casos mediante métodos espectrofotométricos reportados en la literatura. Los pacientes mostraron un incremento en las concentraciones del malonildialdehído y de los productos avanzados de la oxidación de proteínas, se observó además una disminución en las concentraciones de grupos tioles y en la actividad enzimática de la catalasa con respecto al grupo control. No se observaron diferencias entre los grupos para la actividad de la superóxido dismutasa. Los pacientes estudiados presentaron un incremento en el daño oxidativo a lípidos y proteínas, con una disminución en la capacidad de respuesta antioxidante a nivel sistémico.

Palabras clave: Xeroderma pigmentoso, daño oxidativo, defensa antioxidante, estrés oxidativo.

Abstract

Xeroderma pigmentosum is a genodermatosis caused by defects in repairing damaged ADN. Scientific evidences have demonstrated the association between the main clinical symptoms of this disease and oxidative stress related events. The behavior of oxidative damage and antioxidative markers was evaluated at the system level in 23 Cuban patients having a clinical phenotype compatible with phase I of xeroderma pigmentosum and also in 66 apparently healthy subjects as controls. Concentrations in plasma of malonyldialdehyde, advanced protein oxidation products and free thiol groups, as well as the specific enzymatic activities of Cu/Zn dismutase superoxide and catalase were determined by the application of spectrophotometric techniques reported in the literature. An increase in malonyldialdehyde and advanced protein oxidation products, also a decrease in thiol groups and in the catalase enzymatic activity were observed in patients respect to those in the control group. No differences between groups were observed regarding dismutase superoxide activity. The studied patients exhibited an increase in oxidative damage regarding lipids and proteins, with a decrease in the antioxidative response capacity at the system level.

Keywords: Xeroderma pigmentosum, oxidative damage, antioxidant defense, oxidative stress.

^I Máster en Ciencias en Genética Médica. Licenciada en Bioquímica. Investigador Agregado. Profesor Asistente. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: tatianaacosta@infomed.sld.cu.

^{II} Máster en Ciencias en Bioquímica. Licenciada en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Profesor Instructor. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^{III} Especialista de Primer Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Asistente. Universidad Médica de La Habana. La Habana. Cuba.

^{IV} Técnico Medio. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

^V Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Investigador Titular. Profesor Titular. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

Introducción

El xeroderma pigmentoso (XP) es un trastorno genético que presenta un modo de herencia autosómico recesivo. Se ha descrito que este tipo de genodermatosis tiene una prevalencia internacional de uno a cuatro casos por cada un millón de habitantes.¹ Esta enfermedad se caracteriza por una elevada sensibilidad a toda fuente de irradiación ultravioleta y otros mutágenos. Se han referido como base molecular del XP la deficiencia en la reparación de la estructura del ADN. La consecuencia directa es la elevación en el número de mutaciones en la estructura del material genético.^{1,2} Desde el punto de vista clínico, la enfermedad cursa por tres fases: fase eritematopigmentaria, fase atrófica-telangiectásica y fase tumoral. A partir de la segunda fase es donde se evidencia la severidad de este trastorno.³

Los pacientes desarrollan múltiples lesiones cutáneas, sobre todo en zonas expuestas al sol. Se ha reportado una alta incidencia de cáncer cutáneo y otras neoplasias en individuos con este diagnóstico.⁴ El envejecimiento prematuro, los trastornos neurodegenerativos y las anomalías oculares caracterizan el complejo fenotipo clínico de esta enfermedad.^{3,4} Aunque están descritas las bases moleculares, otros mecanismos pudieran estar subyacentes en la fisiopatología de esta genodermatosis. Existen numerosas evidencias que demuestran el vínculo entre el estrés oxidativo y las manifestaciones clínicas del XP.⁵ La comunidad científica se encuentra inmersa en el estudio de la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de enfermedades genéticas como el XP.⁶

En Cuba existe una comisión multidisciplinaria que ha identificado un grupo de individuos en edad pediátrica fundamentalmente, que presenta manifestaciones clínicas similares a la fase I de la enfermedad. Por esta razón, y como parte de las investigaciones llevadas a cabo en nuestro país para abordar esta temática, se llevó a cabo el presente estudio. El objetivo del mismo fue evaluar el comportamiento de algunos indicadores de estrés oxidativo en un grupo de pacientes que presentan manifestaciones clínicas compatibles con la primera fase del XP.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional de tipo analítico y transversal. Se determinaron marcadores de estrés oxidativo en 23 pacientes cubanos (14 masculinos y 9 femeninos) entre los 4-28 años de edad, con manifestaciones clínicas compatibles con la fase I del XP, evaluados por la comisión nacional de atención a esta enfermedad. El período del estudio fue entre

mayo y junio de 2008.

Teniendo en cuenta la naturaleza del estado de estrés oxidativo, se compararon los resultados con los obtenidos para un grupo control constituido por 66 personas sanas residentes en La Habana, en el rango de edades del grupo de pacientes. Los sujetos controles que fueron seleccionados para la realización de este estudio, desde el punto de vista bioquímico, no presentaron alteraciones en los perfiles renales, hepáticos y hematológicos. Además, se demostró ausencia de otras alteraciones bioquímicas que pueden modificar el estado redox en estos sujetos.

Todos los participantes fueron incluidos luego de emitir voluntariamente su consentimiento, siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 2008. Esta investigación fue aprobada por el comité de ética médica del Centro Nacional de Genética Médica.

La muestra biológica empleada en este estudio fue sangre venosa. Se realizó una extracción de 5 mL de sangre mediante venopunción, previo ayuno de ocho horas. Se empleó como anticoagulante EDTAK². El plasma y el lisado de glóbulos rojos se obtuvieron según los procedimientos internacionalmente establecidos para tal fin.⁷ Se determinó la concentración de hemoglobina presente en los lisados de eritrocitos, empleando un analizador hematológico. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la realización del ensayo.

Marcadores de daño oxidativo

La concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) se determinó a partir del método descrito en el ensayo BIOXYTECH® LPO-586TM (OXIS Research, Portland, USA). La concentración plasmática de los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), se determinó a través del método espectrofotométrico descrito por Witko-Sarsat y Friedlander.⁸

Marcadores de defensa antioxidante

La concentración plasmática de los tioles libres, referidos como glutatión reducido (GSH), se realizó mediante el método descrito por Sedlak y Lidsay.⁹ La actividad de las enzimas Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) y catalasa (CAT) intraeritrocitarias fue determinada según los procedimientos descrito por Marklund¹⁰ y Aebi y cols.¹¹ respectivamente.

El estadígrafo descriptivo de tendencia central empleado fue la media aritmética, para todas las variables en los grupos pacientes y controles. Se compararon las medias aritméticas, de cada una de las

variables de respuesta para ambos grupos, mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como criterio de significación estadística, se tomó $p < 0,05$. Para el análisis estadístico, nos servimos del programa Statistica versión 6.0 para Windows (USA).

Resultados

Los resultados obtenidos en esta investigación, indicaron que a nivel sistémico, los pacientes estudiados, presentaron un incremento en las concentraciones de MDA y PAOP (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de los marcadores de daño oxidativo de los pacientes con XP (fase I) y controles.

Marcadores	Pacientes (n=23)	Controles (n= 66)	p
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	5,03 $\pm$ 1,5	0,83 $\pm$ 0,18	0,001
PAOP($\mu\text{mol/L}$)	36,2 $\pm$ 15,5	16,1 $\pm$ 3,0	0,016

*Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar

En relación con los indicadores de defensa antioxidante estudiados, se observó que la relación SOD1/CAT estaba estadísticamente aumentada en los pacientes con respecto a los controles. Paralelamente se demostró disminución en las concentraciones plasmáticas de grupos tioles libres. (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores de defensa antioxidante de los pacientes con XP (fase I) y controles.

Marcadores	Pacientes (n=23)	Controles (n= 66)	p
Cu/Zn SOD (UI/gHb)	2989 $\pm$ 158	2975 $\pm$ 215	0,760
CAT (UI/gHb)	1186 $\pm$ 111	1448 $\pm$ 111	0,005
SOD/CAT	2,67 $\pm$ 0,21	2,20 $\pm$ 0,16	0,026
GSH ($\mu\text{mol/L}$)	21,2 $\pm$ 2,7	29,1 $\pm$ 4,7	0,018

*Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar

Discusión

El daño que provocan las especies reactivas del oxígeno (ERO) a la maquinaria supramolecular y las alteraciones en la homeostasis redox a nivel celular, se han vinculado al inicio y/o progresión

de diversos procesos, como los carcinogénicos, neurodegenerativos y al fotoenvejecimiento.⁶ El estado redox así como sus alteraciones, no se pueden definir utilizando solamente un indicador.¹² En este sentido, se utilizan los llamados marcadores de estrés oxidativo, que incluyen los indicadores de daño oxidativo a biomoléculas y de defensa antioxidante. Estos indican de manera indirecta, si se encuentra afectada la homeostasis redox.¹³

Como consecuencia de la acción de las ERO sobre los lípidos de las membranas biológicas, ocurre la peroxidación lipídica. Entre los productos terminales de este proceso, se encuentra el MDA, comúnmente utilizado como marcador de daño oxidativo de los lípidos.¹⁴

Las altas concentraciones de MDA pueden acelerar la formación de aductos mutagénicos en las células de estos sujetos.¹⁵ Por otra parte, el aumento en este indicador pudiera asociarse a la aparición de neurodegeneración, cáncer, envejecimiento prematuro y trastornos oftalmológicos.^{16,17}

Por otra parte, las ERO pueden modificar la estructura de las proteínas, al oxidar las cadenas laterales de los residuos de sus aminoácidos.¹⁵ Uno de los marcadores empleados para evaluar este tipo de daño son los PAOP, descritos por primera vez en el año 1996 por Witko-Sarsat y cols.⁸ El análisis de los resultados para el indicador PAOP, sugiere un incremento en la oxidación de proteínas en los pacientes estudiados. Teniendo en cuenta que la mayor parte del daño oxidativo a las proteínas es irreparable, este fenómeno puede traer diferentes consecuencias en estos sujetos como: la inhibición de la actividad de enzimas, receptores y proteínas transportadoras de membrana, el aumento de la agregación y una disminución a la susceptibilidad a la proteólisis. Además, pueden ser dañadas algunas de las proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN.^{18,19}

Resultados similares a los alcanzados en este estudio fueron descritos anteriormente por Hayashi y cols. Ellos observaron un incremento en la concentración de productos de la peroxidación lipídica y de proteínas oxidadas en muestras de orina de pacientes con esta enfermedad, lo que se corresponde con una elevación en sangre de estos productos.

En el eritrocito, la relación entre las enzimas antioxidantes SOD1 y CAT es de cooperación aditiva y siguen una vía metabólica para la eliminación de las principales ERO del ambiente celular. En ésta, la enzima SOD1 se encarga de dismutar el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último, se reduce a agua por acción de la enzima

catalasa.²⁰ El alto índice de SOD1/CAT que se obtuvo en los pacientes fue consecuencia de una disminución significativa de la actividad de CAT, frente a una semejante actividad de SOD1. Como consecuencia de ello, se acumula H_2O_2 en los eritrocitos, el cual por su alta capacidad de difusión a través de las membranas celulares, puede oxidar a los lípidos, proteínas y al ADN de la célula donde se origina y de otras células vecinas. Un desequilibrio entre la actividad de SOD1 y CAT tiene el potencial resultado de aumentar la producción de radical hidroxilo, especie química capaz de reaccionar a altas velocidades con casi todo tipo de molécula biológica.^{20, 21} A lo anterior debemos añadir, que los bajos niveles de la actividad de CAT en células sanguíneas se han asociado al desarrollo de diversos tipos de cánceres.²²

Hallazgos similares a los encontrados en este estudio, reportaron Pagano y col.²³ y Villaume y col.²⁴ Estos investigadores observaron que la actividad de la enzima CAT estaba disminuida en diferentes tipos de células de sujetos con diagnóstico de XP.

El GSH es considerado como un antioxidante ya que puede inactivar directamente a algunas ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN), además de actuar como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa (enzima antioxidante). Esta molécula se encuentra distribuida principalmente en el citosol (85-90 %). La síntesis de GSH en la célula está determinada por la disponibilidad del aminoácido cisteína. Cuando hay desbalance redox, el GSH se convierte en su

forma oxidada (GSSG) y de esta manera pasa a la sangre. Dado el funcionamiento de los mecanismos detoxificadores del organismo, el GSSG es eliminado de la circulación sanguínea, lo que provoca la pérdida de dos moléculas de cisteína, por ende en condiciones de estrés oxidativo la síntesis de GSH ocurre a menor velocidad y su conversión a GSSG a mayor velocidad, como resultado la concentración citosólica y sanguínea de GSH disminuye, deprimiéndose la capacidad antioxidante.²⁵

En este primer acercamiento al comportamiento de algunos indicadores de estrés oxidativo en pacientes cubanos que presentan manifestaciones clínicas compatibles con la primera fase del XP, concluimos que en ellos existe un incremento en los niveles de daño oxidativo a lípidos y proteínas y una disminución en los niveles de defensa antioxidante.

El análisis de estos resultados nos apunta que en este grupo de pacientes se pueden desarrollar distintos tipos de cáncer, además de la aparición de trastornos neurológicos,^{3,4} manifestaciones que no presentaban en el momento del estudio.

Consideramos que un tratamiento preventivo, con alguna terapia antioxidante, puede contribuir a mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

Agradecimientos

Queremos agradecer a la Comisión Nacional de atención a niños con xeroderma pigmentoso en Cuba por la colaboración en la realización de este trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Kraemer K. Xeroderma pigmentosum. Gene Reviews. [en línea] 2008 [fecha de acceso May 2011]. URL disponible en: <http://www.genetests.org>
2. Stary A, Sarasin A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie*. 2002;84:49-60
3. Kraemer KH, Lee MM, Scott J. Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Archives of Dermatology*. 1987;123(3):241-50.
4. Ulrich R, Hengge E, Steffen E. Molecular mechanism of xeroderma pigmentosum. In: Ahmad S, Hanaoka F, editors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009: p.1-19
5. Halliwell LB, Gutteridge JM. Cellular response to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 2007:p.187-267
6. Masaharu H. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*. 2009;29(1):1-8.
7. Jacobs D, DeMott W, Grady H, Horvat R, Huestis D and Kasten B. Laboratory test handbook. 1st ed. Hudson. LEXI-COMP INC;1996:p.19
8. Witko-Sarsat V, Friedlander M. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *Journal of Immunology*. 1998;161:2524-32.
9. Sedlak J, Lidsay, RH. Estimation of total protein bound and non-protein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 1968;25:192-205.
10. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 1974;47:469-74.
11. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods enzymology*. 1984;105:121-6.
12. Blumberg J. Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *Journal of Nutrition*. 2004;134:S3188-9.
13. ILSI Europe & Antioxidant. Markers of Oxidative Damage and Antioxidant Protection: Current Status and Relevance to Disease 2000 ILSI Europe Report Series August 2000. ILSI, Brussels, Belgium.

14. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*. 2005;15(4):316-28.
15. Barja de Quiroga G. Radicales libres y antioxidantes [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Químicas]. Madrid. Universidad Complutense: 2000.
16. Serra JA, Domínguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Famulari AL, Boveris A. A systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochemical Research*. 2009;34:212-32.
17. Bickers D, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126:2565–75.
18. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82:47–95.
19. Rossi R, Colombo R, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006;52(4):601-23.
20. Turrens JF. Superoxide dismutase and catalase. In *Comprehensive Toxicology*. McQueen Ch, editors. 2nd Edition. New York; 2010: p.219-27.
21. Jaeschke H. Antioxidant defence mechanisms. In *Comprehensive Toxicology*. McQueen Ch, editors. New York. 2nd Edition: 2010: p.319-37.
22. Fitzpatrick J, Bhargava A, Bedwani R, Gagnon M. Evaluation of blood catalase estimation for diagnosis of malignancy. *Journal of Surgical Oncology*. 2006;1:37-41.
23. Pagano G, Korkina I, Brunk U, Chessa I, Degan P, del Principe D. Congenital disorders sharing oxidative stress and cancer proneness as phenotypic hallmarks: prospects for joint research in pharmacology. *Medical Hypotheses*. 1998;51:253-66.
24. Villaume M, Daya L, Vincens P, Penner JL. Striking differences in cellular catalase activity between two DNA repair-deficient diseases: xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* 1992;13:321-8.
25. Reed M, Thomas R, Pavisic J, James S, Ulrich C and Nijhout H. A mathematical model of glutathione metabolism. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2008;5:8-16.