

## DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN CRISTALINOS HUMANOS CON CATARATAS.

Indhyra Sánchez, Víctor Torres, Olga Moreno, Antonio Rodríguez.

Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Bioquímica. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. e-mail: [tita\\_lucida@hotmail.com](mailto:tita_lucida@hotmail.com)

### Resumen

El desbalance entre la producción de radicales libres y antioxidantes es conocido como estrés oxidativo, el predominio de radicales libres daña las estructuras biológicas. Objetivos: Determinar la existencia del estrés oxidativo en cristalinos con cataratas, relacionándolo con edad, sexo, dieta, consumo de vitaminas, tabaco y otras patologías sistémicas. Metodología: Se utilizó una muestra de 30 cristalinos, seleccionados aleatoriamente de pacientes operados en el Centro Ambulatorio Médico Integral de la Universidad de Los Andes. Estas muestras fueron sometidas a la técnica de determinación del malondialdehído con ácido tiobarbitúrico. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y al test de Tukey de comparación múltiple aplicando un nivel de significación de 0.05. Resultados: En el 83.3% de las muestras se obtuvieron valores, que van de 0.036 a 1.097 nanomoles de malondialdehído sobre gramos de proteínas de cristalino, el 48% consumía vitaminas, 68% tenía otras patologías sistémicas, el 96% consumía frutas, el 89.3% consumía vegetales y el 8% fumaba. Conclusiones: Se comprobó la existencia del estrés oxidativo en la mayoría de los pacientes y se demostró la relación existente entre las variables estudiadas con los niveles del estrés oxidativo. Se demostró que los radicales libres pueden ser una importante causa de dicha patología.

**Palabras clave:** estrés oxidativo; cataratas; peroxidación lipídica.

### Abstract

#### Determination of oxidative stress by means of lipid peroxidation in human crystalline lens with cataracts.

The imbalance between the production of free radicals and antioxidants is known as oxidative stress, the prevalence of free radicals damages biological structures. Objectives: To determine the existence of the oxidative stress in crystalline with cataracts by the quantification of lipid peroxidation, to relate it to age, sex, diet, vitamin consumption of vitamin, smoking and other systemic pathologies. Methodology: Sample of 30 crystalline lens was used, selected random from patients operated at the Ambulatory Integral Medical Center of the University of The Andes. These samples were subjected to technique of determination of malondialdehyde with the thiobarbituric acid. The means were subjected to the analysis of variance and the Tukey test of multiple comparisons using a signification level of 0.05. Results: 83.3% of samples had values between 0.036 and 1.097 malondialdehyde nanomoles per gram of crystalline proteins, 48% consumed vitamins, 68% had other systemic pathologies, 96% consumed fruits, 89.3% consumed vegetables and 8% were smokers. Conclusions: the existence of oxidative stress in most patients was verified, and it was shown the relationship between the oxidative stress and the studied variables. It was shown that free radicals could be an important cause of this pathology.

**Keywords:** oxidative stress; cataracts; lipid peroxidation.

### INTRODUCCIÓN.

Todas las células están permanentemente produciendo moléculas con electrones desapareados llamados radicales libres; proceso natural, inevitable y constante. El daño que los radicales libres provocan en los diferentes tejidos, se debe a que ellos reaccionan químicamente con los lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN. Este daño es llamado estrés oxidativo, que depende del balance entre los radicales libres y las defensas antioxidantes que dispone el organismo humano. El estrés oxidativo particularmente en los lípidos produce peroxidación lipídica, afectando los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados o fosfolípidos polinsaturados, en un proceso autocatalítico, fragmentando los ácidos grasos y formando hidroperóxidos y aldehídos

citotóxicos. Las estructuras de la bicapa lipídica de las membranas celulares, son muy susceptibles a la peroxidación lipídica, lo que puede producir la lesión de dichas membranas celulares y de otros componentes intracelulares. Este proceso de la peroxidación lipídica da lugar a la formación de compuestos tales como hidrocarburos (eteno, pentano, etc.), alkenales y aldehídos siendo el malondialdehído un buen marcador biológico de éste proceso (Alonso et al. 1999). Sabiendo que el estrés oxidativo está relacionado con la opacificación del cristalino llamada catarata (Basygit 2005), patología con gran incidencia en nuestro medio ya que es la causa del 47.8% de los casos de ceguera a escala mundial y sigue siendo el principal reto en la lucha contra la ceguera evitable, en particular en los países en desarrollo (Donma et al. 2002).

El objetivo de esta investigación fue determinar mediante la peroxidación lipídica los niveles de estrés oxidativo en cristalinos con cataratas y relacionar dichos valores con la edad, sexo, dieta, consumo de suplementos vitamínicos, consumo de tabaco y otras patologías sistémicas. Esperando niveles elevados de estrés oxidativos en personas que consumen pocos vegetales, frutas y suplementos vitamínicos así como también en personas que consumen tabaco (Halliwell y Gutteridge 1989), para demostrar que el modo de vida de una persona pueda ser un factor determinante en la formación de cataratas, sobre todo aumentar aquellos agentes que disminuyan la producción de radicales libres, para la prevención de esta patología, sobre todo en nuestro país, ya que no se han realizados suficientes investigaciones del estrés oxidativo en cristalinos.

#### **METODOLOGÍA.**

El diseño de esta investigación es de tipo experimental de corte transversal, se obtuvieron 30 muestras de cristalinos seleccionados aleatoriamente de pacientes que fueron operados de cataratas en el Centro Ambulatorio Médico Integral de La Universidad de Los Andes (C.A.M.I.U.L.A.), a dichos pacientes se les solicitó su consentimiento, aceptando a colaborar con esta investigación además de proporcionar información acerca de su dieta, consumo de suplementos vitamínicos y consumo de tabaco. Luego estos cristalinos fueron transportados en un medio de cultivo HBS (Hepes Buffered Solution) (Pansini et al. 2005) para conservar la integridad de las estructuras biológicas hasta su manipulación en el laboratorio; seguidamente todos los cristalinos fueron pesados y homogenizados con 5 ml de agua destilada con un homogenizador de vidrio (Thomas A3528, USA). La producción de radicales libres se determinó mediante la medición de la concentración del malondialdehído en los homogenatos de cristalino mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico, para llevar a cabo este método se tomaron 500 µl del homogenato al cual se le agregó 1.5 ml de ácido acético al 20%, 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 1% y 10 µl de BHT (butylated hydroxytoluene), los tubos de ensayo con la mezcla se colocaron a 100 °C en baño de María durante 60 min. Se enfriaron a temperatura ambiente, fueron posteriormente centrifugados (centrífuga Optima II) durante 10 min a 3000 rpm. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Agilent 8453 a 532 nm. En contra de un blanco tratado de igual manera, pero que tenía agua destilada en lugar de la muestra. Luego de obtener este valor es necesaria la determinación de proteínas, ya que el resultado se expresa en nanomoles

de malondialdehído por gramos de proteínas: esta se realizó mediante la técnica de determinación de la concentración de proteínas por colorimetría en la cual se usa una curva de calibración con la albúmina bovina (BSA) como estándar midiendo la densidad óptica a 279 nm. Luego se determina la concentración mediante la fórmula:  $[BSA] \text{ (mg/ml)} = D.O_{.279nm} \times 13/9$

Posteriormente se colocan 10 µl de la muestra más 490 µl de agua destilada para agregarle 1 ml de la solución A+B. Para obtener esa solución A+B se mezclaron 50 ml de la solución A que contiene carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio al 2%, tartrato de sodio y potasio al 0.16% y SDS (sodium dodecylsulfate) al 10% con 500 µl de la solución B, la cual está compuesta por sulfato de cobre al 4%. A esa nueva solución se llamó C y a esta se le colocó 100 µl del reactivo de Folin diluido, colocándose durante 10 min a 37 °C en baño de María. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Agilent 8453 a 750 nm.

Al tener los valores de la peroxidación lipídica y el de las proteínas se procedió a relacionarlos para obtener los valores de nmoles de MDA por g de proteína de cristalino. (Ejemplo: muestra 1; 1000 ml tienen 1.79 nmoles, y 1 ml tiene 0.00503 g, se multiplica este valor por 1000 = 5.03 g, luego se divide 1.79 nmoles entre 5.03 g y se obtiene 0.356 nmoles de MDA/g de proteína de cristalino).

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó un análisis de varianza y las pruebas de Tukey de comparación múltiple y la t de Student aplicando un nivel de significación de un 5%, para lo cual se usó el software GraphPAD Prism versión 2.01, 1996.

#### **RESULTADOS.**

Luego de realizar las técnicas tanto de peroxidación lipídica como de determinación de proteínas y realizar los cálculos matemáticos para obtener los valores comparables de estrés oxidativo, se observó que en el 83.3% de las muestras se determinaron valores que van de 0.036 a 1.097 nanomoles de malondialdehído sobre gramos de proteínas de cristalino (tabla 1).

Relacionando los valores de estrés oxidativo de las muestras que se lograron cuantificar, con los datos arrojados en las encuestas se observa que las edades con mayores niveles de estrés oxidativo eran de 60 a 90 años representando el 84% (tabla 2).

Además, los niveles de estrés oxidativo fueron comparados con diabetes y otras patologías como hipertensión arterial, cáncer, enfermedades respiratorias, problemas auditivos y problemas psiquiátricos, obteniendo que el 68% de los pacientes tenía otras patologías sistémicas (tabla 3).

Asimismo se compararon los valores con los de los pacientes que tomaban suplementos vitamínicos, donde sólo el 48% lo hacía. Igualmente, se

compararon con los de la ingesta de frutas donde sólo 4% no consumía (tabla 4).

Tabla 1.- Valores de proteína total y peroxidación lipídica de cristalinos de pacientes con distintas patologías.

Muestras	Proteína total (mg/ml de homogenato de cristalino)	TBARS (nM de MDA) del homogenato de cristalino	nmoles de MDA/g de proteína de cristalino
1	5.03	2.97	0.590
2	25.59	10.27	0.401
3	19.21	21.07	1.097
4	15.27	8.87	0.578
5	21.46	8.04	0.375
6	16.30	ND	ND
7	15.92	5.77	0.362
8	19.87	6.77	0.341
9	12.07	2.00	0.165
10	14.61	2.62	0.179
11	43.81	3.04	0.069
12	11.23	2.40	0.214
13	17.71	ND	ND
14	10.85	ND	ND
15	17.24	4.81	0.279
16	17.99	7.88	0.438
17	33.57	8.07	0.240
18	19.30	0.92	0.048
19	31.34	2.02	0.064
20	36.2	ND	ND
21	54.76	3.88	0.071
22	45.08	2.49	0.055
23	53.94	4.11	0.076
24	49.79	5.04	0.101
25	45.02	7.36	0.163
26	59.42	7.13	0.120
27	21.75	0.78	0.036
28	22.10	1.19	0.054
29	13.80	ND	ND
30	15.60	0.92	0.059

Tabla 2. Peroxidación lipídica en cristalinos de pacientes según la edad.

Edad (años)	Valores de peroxidación lipídica (nmoles de MDA/g de proteína de cristalino) (media ± SD, n = número de muestras)
40-50	0.064 (n=1)
51-60	0.092 ± 0.034 (n=3)
61-70	0.211 ± 0.137 (n=7)
71-80	0.292 ± 0.194 (n=7)
81-90	0.330 ± 0.388 (n=7)

En esta investigación se consideró evaluar los valores del estrés oxidativo entre los sexos, en el cual las mujeres predominan en este estudio con un 68% y los hombres con un 32% (tabla 5). De igual forma, el tabaco se tomó en cuenta en el estudio ya que es un oxidante por excelencia (Resnikoff et al. 2004), sólo el 8% fumaba (tabla 6).

## DISCUSIÓN.

Al revisar la literatura sobre experimentos del estrés oxidativo, se encontró que la mayoría de los estudios utilizan ratas y varios de estos utilizan la técnica de determinación del óxido nítrico para cuantificar el valor del estrés oxidativo. En esta investigación, de los 30 cristalinos utilizados se pudo determinar valores en 25 cristalinos, representando esto el 83.3%, permitiendo destacar que esta técnica es eficiente para determinar valores del estrés oxidativo en muestras de cristalinos con cataratas de humanos. Es importante destacar que hay una tendencia a incrementar los valores de estrés oxidativo a medida que las personas envejecen, pudiendo ser esto, una causa del incremento en la incidencia de cataratas en pacientes mayores de 60 años de edad, al igual que lo encontrado por Tarwadi (2004). Se observaron valores aumentados en cristalinos pertenecientes al sexo femenino, quizás se deba a que los niveles hormonales post-menopáusicos puedan ser una causa de este hallazgo como lo afirman Pansini et al. (2005).

Se pudo observar que el consumo regular de frutas reduce los niveles del estrés oxidativo, así como también el consumo de vegetales, en concordancia con lo dicho por Tarwadi (2004); una importante conclusión, ya que se cree que mejorando los hábitos alimenticios, se pudiera reducir el riesgo de presentar cataratas.

El consumo de tabaco incrementa notablemente los valores, indicando que el tabaco es un agente importante en la producción de radicales libres como lo señala Basyigit et al. (2005). Sin embargo, el hecho de presentar otras patologías como diabetes, hipertensión arterial, problemas auditivos y cáncer, no se relaciona con los niveles de estrés oxidativo, ya que no se observan variaciones notables de los niveles entre personas con y sin patologías sistémicas. Quizás se deba a que los cristalinos son estructuras más sensibles a los efectos dañinos de los radicales libres, en contraposición a lo encontrado por Donma et al. (2002) quienes relacionaron los niveles de estrés oxidativo en plasma de personas con diabetes y sin esta enfermedad.

Tabla 3. Peroxidación lipídica en cristalinos de pacientes con distintas patologías.

Patologías	Valores de peroxidación lipídica (nmoles de MDA/g de proteína de cristalino) (media ± SD, n = número de muestras)
Todos los pacientes	0.247 ± 0.244 (n=25)
Diabéticos	0.185 ± 0.106 (n=6)
Otras patologías	0.263 ± 0.290 (n=11)
Sin patologías	0.218 ± 0.217 (n=8)

Tabla 4. Efecto de la ingesta de vitaminas y frutas en la peroxidación lipídica de cristalinos de pacientes con distintas patologías.

Tipo de ingesta	Valores de peroxidación lipídica (nmoles de MDA/g de proteína de cristalino) (media ± SD, n = número de muestras)
Ingesta de vitaminas	0.213 ± 0.179 (n=12)
Sin ingesta de vitaminas	0.279 (n=1)
Sin ingesta de frutas	0.362 (n=1)

Tabla 5. Efecto del sexo en la peroxidación lipídica de cristalinos de pacientes con distintas patologías.

Sexo	Valores de peroxidación lipídica (nmoles de MDA/g de proteína de cristalino) (media ± SD, n = número de muestras)
Femenino	0.283 ± 0.282 (n=17)
Masculino	0.170 ± 0.110 (n=8)

Tabla 6. Efecto del uso del tabaco en la peroxidación lipídica de cristalinos de pacientes con distintas patologías.

Sexo	Valores de peroxidación lipídica (nmoles de MDA/g de proteína de cristalino) (media ± SD, n = número de muestras)
No fumadores	0.259 ± 0.250 (n=23)
Fumadores	0.111 ± 0.074 (n=2)

#### REFERENCIAS.

- Alonso DP, Salucci M, Lázaro R et al. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. Rev Cubana Aliment Nutr 13: 104-111.
- Basyigit I, Yildiz F, Cekmen M et al. 2005. Effects of erdosteine on smoking-induced lipid peroxidation in healthy smokers. Drugs in R&D 6: 83-89.
- Donma O, Yorulmaz E, Pekel H et al. 2002. Blood and lipid peroxidation and antioxidant status in normal individuals, senile and diabetic cataractous patients. Current eye research. 25: 9-16.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. London: Clarendon Press.
- Pansini F, Mollica G, Bergamini CM. 2005. Management of the menopausal disturbances and oxidative stress. Current pharmaceutical design 11: 2063-2073.
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D et al. 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. Bulletin of the World Health Organization 82.
- Tarwadi K. 2004. Linkages of antioxidant, micronutrient, and socioeconomic status with the degree of oxidative stress and lens opacity in indian cataract patients. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 20: 261-267.
- Vit P. 1997. Cataratas y mieles terapéuticas. Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

Recibido: 1 junio 2011      Aceptado: 20 junio 2011

#### MedULA en Internet

Usted puede acceder y descargar todos los contenidos de la revista **MedULA**, a texto completo con figuras a todo color, desde algunas de las siguientes páginas de la Web, entre otras

[www.periodica.org](http://www.periodica.org); [www.doaj.org](http://www.doaj.org); [www.freemedicaljournals.com](http://www.freemedicaljournals.com); [www.saber.ula.ve/medula](http://www.saber.ula.ve/medula);  
[www.latindex.org](http://www.latindex.org); [www.fj4d.com](http://www.fj4d.com); <http://dialnet.unirioja.es/servlet/let/extrev?codigo=7642>;  
[www.portalesmedicos.com](http://www.portalesmedicos.com); <http://web5.infotracc.galegroup.com>; [www.ebsco.com](http://www.ebsco.com);  
[www.monografias.com](http://www.monografias.com); [www.imbiomed.com](http://www.imbiomed.com); [www.indexcopernicus.com](http://www.indexcopernicus.com)