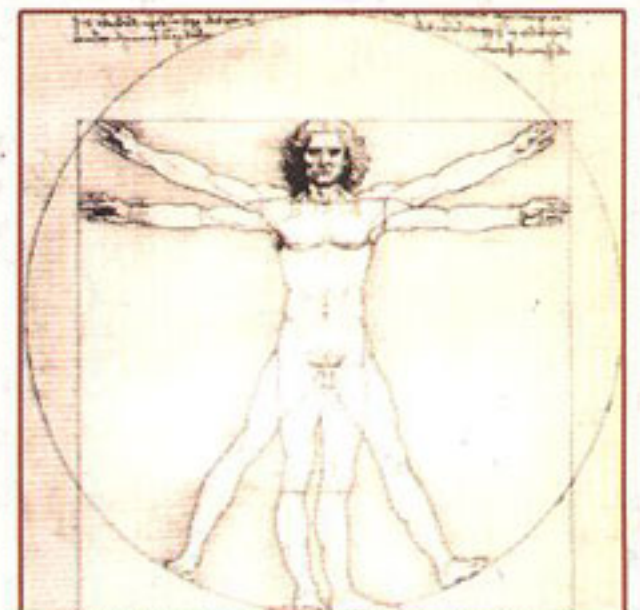




Acta Científica

de la Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas

Volumen 11 • N° 1 • Año 2008 • ISSN 1315-1746 • Depósito Legal pp 199202DF899 • Suscrita a Lilacs, Asereme, Bireme





Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Editorial	1
Análisis de la composición poblacional de aislados venezolanos de <i>Trypanosoma cruzi</i> I, provenientes de un hospedador humano, un insecto triatomineo y un reservorio natural Denisse Ugueto León, Anny Pomenta Rojas, Hernán J. Carrasco	3
Clonamiento y expresión heteróloga en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la acuaporina 2 de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcAQP2) Silvana Verlezza, Catherine Figarella, José Luis Ramírez, Néstor L. Uzcátegui	12
La dimetilarginina asimétrica, estructura e implicaciones patológicas Julio César González Martínez, Dora Cristina González Rodríguez, Leticia María Figueira De Freitas	22
Efecto de la vitamina C, sobre la actividad de glutatión peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica Figueira Leticia, González Julio C.	30
Efecto del ayuno y hora de toma de muestras sobre las determinaciones en química clínica Bustamante Y., Rodríguez R., Rodríguez J., Briones N.	37
Información para los autores	41

EDITORIAL

Esta nueva publicación de nuestra Revista llega con atraso en su edición. Esperamos que con el esfuerzo de nuestros colegas, en el próximo Congreso de Bioanálisis podamos conseguir los suficientes trabajos para poner al día nuestro órgano de divulgación científica, como lo es "Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas". La entrega de este número se hace durante el desarrollo del Congreso Venezolano de Bioanálisis, en el Hotel Maremare de Puerta la Cruz. Nuevamente, el estado Anzoátegui es el escenario del más importante evento científico del gremio. Muchas son las expectativas en cuanto a asistencia y organización, pero seguro estamos que se cumplirán. Desde ya quiero dar un reconocimiento al Lic. Valmore Rodríguez por su calidad humana, su generosidad, su amistad y entusiasmo, llevando a cabo esta tarea, lo mismo al Comité Organizador, excelentes colegas que generosamente y con responsabilidad dedican su tiempo a la organización del Congreso, trabajando en equipo con la Junta Directiva de la Sociedad.

Es importante destacar que este año la SVBE cumple 25 años de presencia. Parecen muchos años, pero en su existencia han habido cambios muy importantes donde la Sociedad ha sufrido muchas transformaciones. Hoy en día nuevamente estamos a la expectativa de nuevos horizontes, que logren que nuestra Sociedad se convierta en un organismo fuerte, con una gran visibilidad en el mundo científico. Para ello necesitamos crecer, ser muchos más. Necesitamos a todos los jóvenes especialistas del país, para que le den esta fortaleza científica que el gremio necesita. De mi parte pido a Dios me dé toda la fortaleza y sabiduría para llevar adelante esta Sociedad, junto con ese equipo extraordinario que es la Junta Directiva.

Algo que también queremos dar a conocer es nuestra felicidad. Al fin, después de varios años de trabajo hemos logrado el primer diplomado. Es nuestro primer ensayo, pero esperamos que esta experiencia se mejore y se realicen otros, para beneficio del gremio de Bioanálisis.

Mis respetos

Dra. Ana Monzón de Orozco
Presidenta de la Sociedad de Bioanalistas Especialistas



Análisis de la composición poblacional de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* I, provenientes de un hospedador humano, un insecto triatomineo y un reservorio natural

Denisse Ugueto León^{1,2}, Anny Pomenta Rojas^{1,2}, Hernán J. Carrasco^{1,*}

Recibido: 7 Septiembre 2009; Aceptado: 18 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

Se analizó la composición poblacional de aislados venezolanos pertenecientes al grupo TcI, provenientes de distintos hospedadores. El análisis fue realizado mediante la clonación de los aislados utilizando la técnica de plaqueo, de la cual se originaron clones de cada uno que posteriormente fueron comparados mediante la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD). La observación de los perfiles de bandas obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa, mostró diferencias en cuanto el número y la posición de bandas en los clones obtenidos de los aislados provenientes de humano y del reservorio natural (*Didelphis marsupialis*), mientras que para el aislado proveniente del vector (*Triatoma nigromaculata*), todos los clones generaron perfiles de bandas similares. Estos resultados evidencian una heterogeneidad poblacional para el caso de los dos primeros aislados. El índice de variabilidad genética fue diferente para cada uno de los aislados, siendo mayor para dos aislados provenientes de dos pacientes chagásicos, mostrando un valor de 0.1652 y 0.0853 respectivamente, mientras que para el aislado proveniente del reservorio natural, se obtuvo un valor de 0.0312. Estos resultados indican el polimorfismo existente entre clones provenientes de un mismo aislado, siendo indicativo de la existencia de heterogeneidad intrapoblacional, lo cual pudiese tener implicaciones en la diversidad de manifestaciones clínicas reportadas para infecciones con *T. cruzi* I.

Palabras clave: *T. cruzi*, polimorfismo genético, heterogeneidad poblacional, enfermedad de Chagas.

Analysis of the population composition of venezuelans isolates of *trypanosoma cruzi* I from a human host, a triatomine insect and a natural reservoir

SUMMARY

It was analyzed the population composition of Venezuelan isolates belonging to the genotype TcI from different hosts. The analysis was carried out through the cloning of the isolates using the plating technique, obtaining clones of each one of them, which were afterward compared using the random amplified polymorphic DNA technique (RAPD). The observation of bands' profiles obtained by agarose gel electrophoresis, showed differences regarding to the number and position of the bands between the isolates from both humans and natural reservoir (*Didelphis marsupialis*), except for the clones obtained from the vector isolate (*Triatoma nigromaculata*), where all of them gave the same pattern of bands. This result reveals the presence of population heterogeneity for the isolates from human and natural host. The genetic variability index was different in each one of the isolates, being higher for the isolates from two chagasic patients, showing values of 0.1652 and 0.0853 respectively; and for the isolate from the natural reservoir the index value was 0.0312. These results reveals the presence of polymorphism between the clones obtained from the same isolate, showing the existence of intra-population heterogeneity, which might have implications on the diversity of clinical manifestations previously reported with *T. cruzi* I infections.

Keywords: *T. cruzi*, genetic polymorphism, population heterogeneity, Chagas disease.

* Solicitar copia a: henan.carrasco@ucv.ve.

1. Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Instituto de Medicina Tropical Dr. Felix Pifano.UCV.

2. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Introducción

Trypanosoma cruzi es un protozoario hemoflagelado, perteneciente al orden kinetoplastida, que involucra dentro de su ciclo de vida a una amplia variedad de vertebrados (mamíferos domésticos y silvestres incluyendo el hombre) e invertebrados (insectos *Triatomino*s), causante de la enfermedad de Chagas, la cual fue descubierta en el año 1909 por Carlos Chagas. Dicha enfermedad se caracteriza por presentar un curso clínico variable, que por lo general se inicia con una fase aguda, para luego pasar a una fase crónica.

Numerosos estudios biológicos, bioquímicos y moleculares han mostrado que *T. cruzi* presenta una alta variabilidad a nivel genético (1-3). El estudio pionero en la determinación de distintos grupos de *T. cruzi*, fue basado en los perfiles de seis isoenzimas, que permitió una primera clasificación en Zimodemos, denominados Z1, Z2 y Z3 (4-6). Este estudio, seguido de otros análisis empleando técnicas moleculares como el análisis de genes ribosomales (ARNr) y de miniexon, permitieron la descripción de dos linajes distintos y filogenéticamente distantes de *T. cruzi*, denominados *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), donde se asocia principalmente al ciclo doméstico el linaje I y al ciclo selvático el linaje II (7,89). De los dos grupos, TcI es considerado hasta los momentos como un grupo homogéneo, mientras que TcII presenta a su vez cinco subgrupos que van desde (II a-e). En la actualidad existen otras técnicas moleculares para el estudio genético de *T. cruzi*, como lo son la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) (9). A partir de esta clasificación, diversos estudios han sido orientados a tratar de correlacionar la diversidad genética del parásito con sus características biológicas (10). De igual manera se han planteado correlaciones entre subpoblaciones del parásito y el éxito de la infección en mamíferos silvestres, en hospederos y en la ecología que el mismo abarca (11).

En Venezuela, un estudio realizado por Añez y col. (12), reveló un mayor número de pacientes infectados con el grupo *T. cruzi* I. En infecciones experimentales, se ha encontrado que el grupo al que pertenecen los parásitos determinan el tropismo a los tejidos, la parasitemia y la patogénesis de la enfermedad (9,13,14).

En la presente investigación, teniendo como base el conocimiento actualmente existente sobre la heterogeneidad poblacional de *T. cruzi*, nos propusimos estudiar la composición poblacional de tres aislados venezolanos pertenecientes al grupo TcI, provenientes de distintos hospedadores involucrados en el ciclo de vida del parásito, el hombre, un mamífero silvestre reservorio del parásito en la

naturaleza (*Didelphys marsupiales*) y de *Triatoma nigromaculata*, insecto Triatomino vector del parásito, con el objetivo de conocer si existe heterogeneidad intrapoblacional dentro de dichos aislados y por ende dentro del grupo TcI. Para lograr esto, se utilizó la técnica de plaqueo, según el protocolo descrito por Yeo y col (15) y la técnica de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD), para realizar la comparación intrapoblacional por medio del análisis de patrones de bandas originados por cada uno de los clones derivados de cada aislado.

La determinación de variabilidad genética intra-poblacional en aislados de *T. cruzi* I, puede tener gran significancia en el desarrollo de la enfermedad y las manifestaciones clínicas en el hombre, constituyéndose el presente estudio en un aporte para tratar de explicar la diversidad con la que las mismas se presentan. Es de hacer notar que aun después de tanto tiempo de haber sido descubierto este parásito, existan grandes interrogantes sobre el comportamiento del mismo y los factores que determinan el curso de la infección en humanos.

Materiales y Métodos

El origen de los parásitos incluidos en este estudio se muestra en la tabla I. Estos aislados provenientes de humano, mamífero silvestre y triatomino fueron suministrados por el criobanco del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, del Instituto de Medicina Tropical Dr. Felix Pifano. Sin embargo el procedimiento inicial para su obtención desde distintos hospedadores y el vector, fue mediante xenodiagnóstico indirecto con la sangre del paciente, hemocultivo de sangre cardiaca del mamífero silvestre *D. marsupialis* y de sangre obtenida de un ratón previamente infectado con las heces extraídas por disección del intestino del insecto naturalmente infectado. Los parásitos se mantuvieron en un medio de cultivo bifásico a 26°C Agar-Sangre (agar, 10% sangre defibrinada de conejo; 0,89 solución salina estéril suplementada con 50 mg/ml gentamicina), siendo revisados cada dos días, hasta observar un crecimiento óptimo de los parásitos. Finalmente, se analizaron cuatro aislados, dos provenientes de humano, uno de *D. marsupialis* (rabipelado) y otro de un insecto vector *Triatoma nigromaculata* (Tabla 1).

Clonación de aislados

Técnica de plaqueo

La técnica de plaqueo tiene como fin el aislamiento de colonias de *T. cruzi*, las cuales cada una se originan a partir de una sola célula o parásito, en placas de agar-sangre fortificado. La misma consta de dos fases, una fase semisólida en la cual va a estar contenida una suspensión de parásitos en un número conocido de un aislado en específico, constituida por el medio RPMI, antibióticos, agarosa de bajo punto de fusión (LPM) al

3% y medio de cultivo; y una capa sólida constituida por agar sangre, sales y una mezcla de antibióticos, esta última con el fin de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento de los parásitos. La fase semisólida va a ser vertida sobre la fase sólida, garantizando la expansión de la misma por toda la superficie con el fin de que los parásitos se dispersen de forma homogénea y así obtener colonias aisladas que van a corresponder a los clones que fueron empleados para el estudio.

Tabla 1. Origen de los aislados incluidos en el estudio.

Aislado	Genotipo	Hospedador	Localidad	Año
X12914	TcI	Humano	Miranda	2005
X10968	TcI	Humano	Sucre	2002
DMJ0108	TcI	Marsupial (<i>Didelphys marsupialis</i>)	Portuguesa	2008
VE46708	TcI	Vector (<i>Triatoma nigromaculata</i>)	Miranda	2008

Transplante de colonias

Las colonias individuales se obtuvieron de las placas, con una punta de pipeta estéril y se trasladaron a tubos de agar sangre con solución salina al 0.9%, siendo transferidos luego de su crecimiento a medio líquido RPMI enriquecido. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta observar un crecimiento importante de los mismos en fase exponencial y se utilizó un volumen equivalente a 20×10^6 epimastigotes/ml, para posteriormente ser sometidos a la extracción de ADN, según el método reportado por el protocolo de Williams y col. (16), modificado por Carrasco y col. (17). Se utilizó el kit de extracción Nucleon BA CC2 Extraction Purification Amersham Life Science®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cuantificación de DNA

Para la cuantificación de DNA de cada muestra, se realizó una dilución 1/10 en agua MiliQ y se determinó su absorbancia a través de un espectrofotómetro BIO-RAD Smartspec 3000, considerando una relación de absorbancia 260/280 nm entre 1,8 y 2,3 como indicador de pureza óptimo tomando en cuenta 1 unidad de D.O. es equivalente a 50µg DNA/ml de solución ($1U.A_{260} = 50\mu\text{g/ml ADN}$).

Caracterización genética de los clones

Los clones y los aislados originales fueron sometidos a la técnica de Amplificación aleatoria de DNA Polimórfico (RAPD). La reacción de ampliación se desarrolló según el método reportado por el protocolo de Williams y col. (16), modificado por Carrasco y col. (17). Para ello se utilizó una

mezcla de reacción de 20 µl, que contenía 0,2mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), 20 pg de oligonucleótido; 1,0 unidad de Taq DNA polimerasa (Stratagene, La Jolla, C.A); 5ng de DNA genómico; 1,5 mM MgCl₂; 50mM KCL; 10 mM Tris- HCL (pH8,8). Para la amplificación se utilizaron los siguientes iniciadores o primers de British Bio- technology Products Ltd (Oxon, United Kingdom):

A1 (5'-TCACGATGCA-3')

A2 (5'-GAAACGGGTG-3')

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 minutos; 30°C por 2 minutos; 72°C por un minuto (una vez); 94°C por 30 segundos; 40°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (32 veces), con una extensión final a 72°C por 5 minutos. El control negativo de la reacción incluyó todos los componentes con excepción del DNA molde o muestra, el cual se sustituyó por agua Milli Q estéril.

La separación de los productos de amplificación se realizó con una electroforesis en gel de agarosa (Ultra pura) al 2,5%, a 80 V por 90 minutos. Las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Cada corrida electroforética incluía las cepas de referencia que se observan en la Tabla 2 y el marcador de peso molecular. Finalmente se obtuvo un registro fotográfico de los productos amplificados, por medio de una cámara Kodak® y se transfirió a un sistema computarizado Kodak®.

Tabla 2. Cepas de referencia.

Cepa	Origen	Zymodemo	Principal
WA250 cl 10b	Humano		Z1 (TcI)
Esmerado cl2	Humano		Z2 (TcIIb)
CAN II	Humano		Z3 (TcIIa)

Análisis estadístico

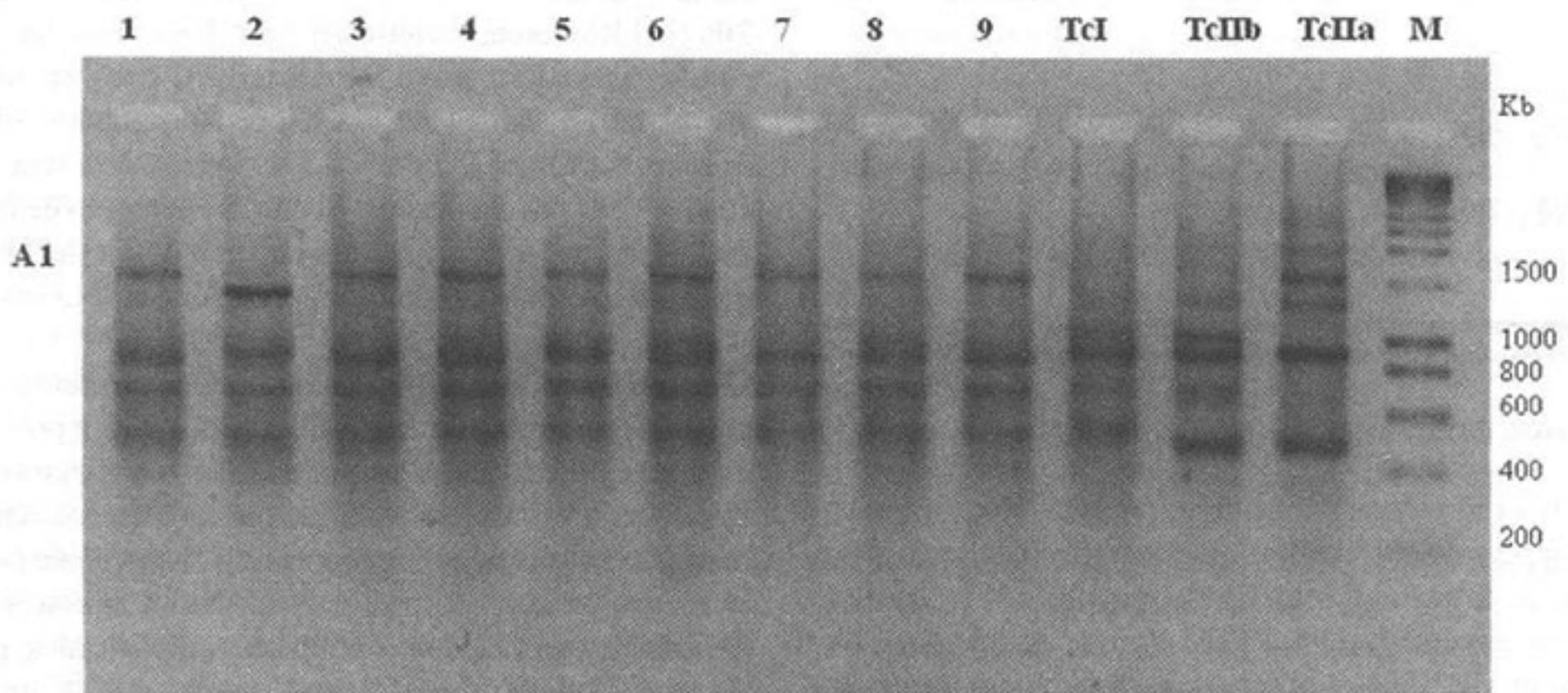
Los resultados se analizaron través del programa estadístico Popgene versión 1.31 de análisis de genética de poblaciones. Para ello se construyeron matrices de tipo uno cero, según la presencia o ausencia de bandas respectivamente. El programa generó los índices y valores que adelante se expresaran.

Resultados

La comparación de los perfiles de RAPD entre los clones provenientes de cada aislado, mostró diferencias en cuanto al número y posición de las bandas. Este es el caso de los aislados provenientes de humano X12914 (Figura 1 y 2) y X10968,

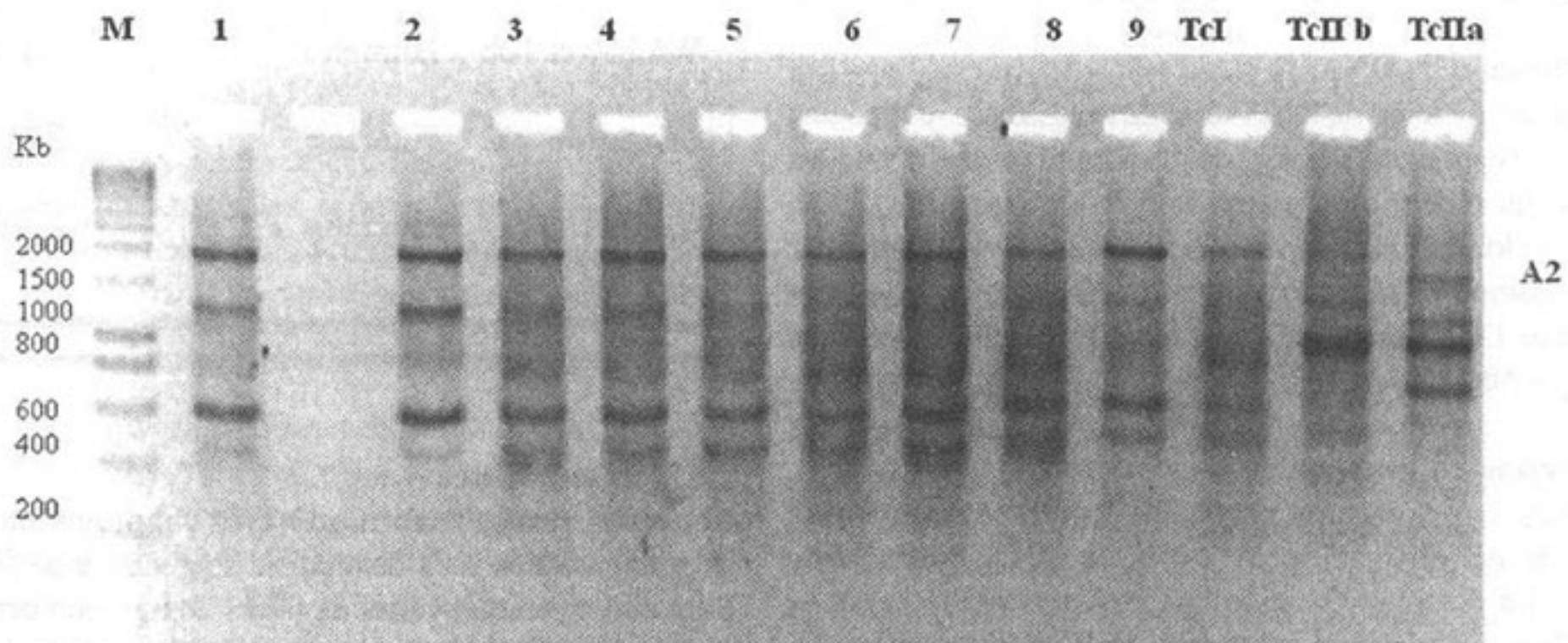
(Figura 3 y 4) igualmente el aislado DMJ0108 (Figura 5 y 6) no siendo así, para el VE46708 (Figura 7 y 8). Esto se observa en los índices de variabilidad genética, proyectados por el programa Popgene versión 1.31, éste permite el análisis de variación genética entre poblaciones naturales utilizando rasgos de dominancia y co-dominancia.

Figura 1. Perfil de bandas obtenido con el primer A1 para el aislado X12914 y los clones derivados de este. El carril 1 corresponde al aislado original; a partir de los carriles 2 hasta el 9 se observan los perfiles de bandas de los clones obtenidos de este aislado, así como las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa, indicados en el gel. En el último carril se muestra el marcador de peso molecular Hiperlader I.



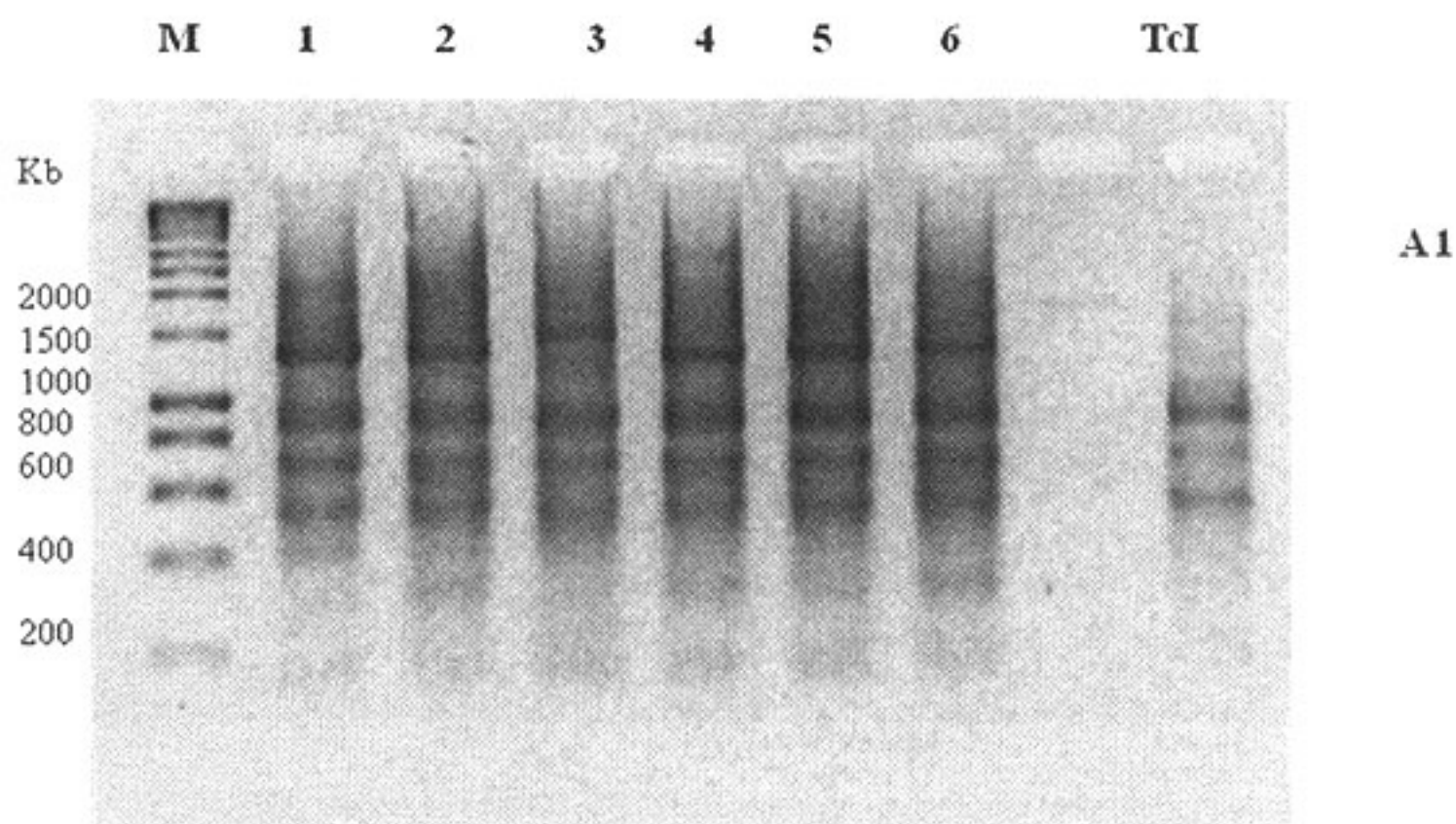
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X12914 con el primer A1.

Figura 2. Perfil de bandas obtenido para el aislado X12914, con el primer A2. El carril designado como M, muestra el perfil de banda correspondiente al marcador de peso molecular (Hiperlader I). El carril 1 corresponde al aislado original, a partir del cual se derivan los clones estudiados, cuyos perfiles de bandas se encuentran ubicados desde el carril 2 hasta el 9. Los últimos tres carriles corresponden a la cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa respectivamente.



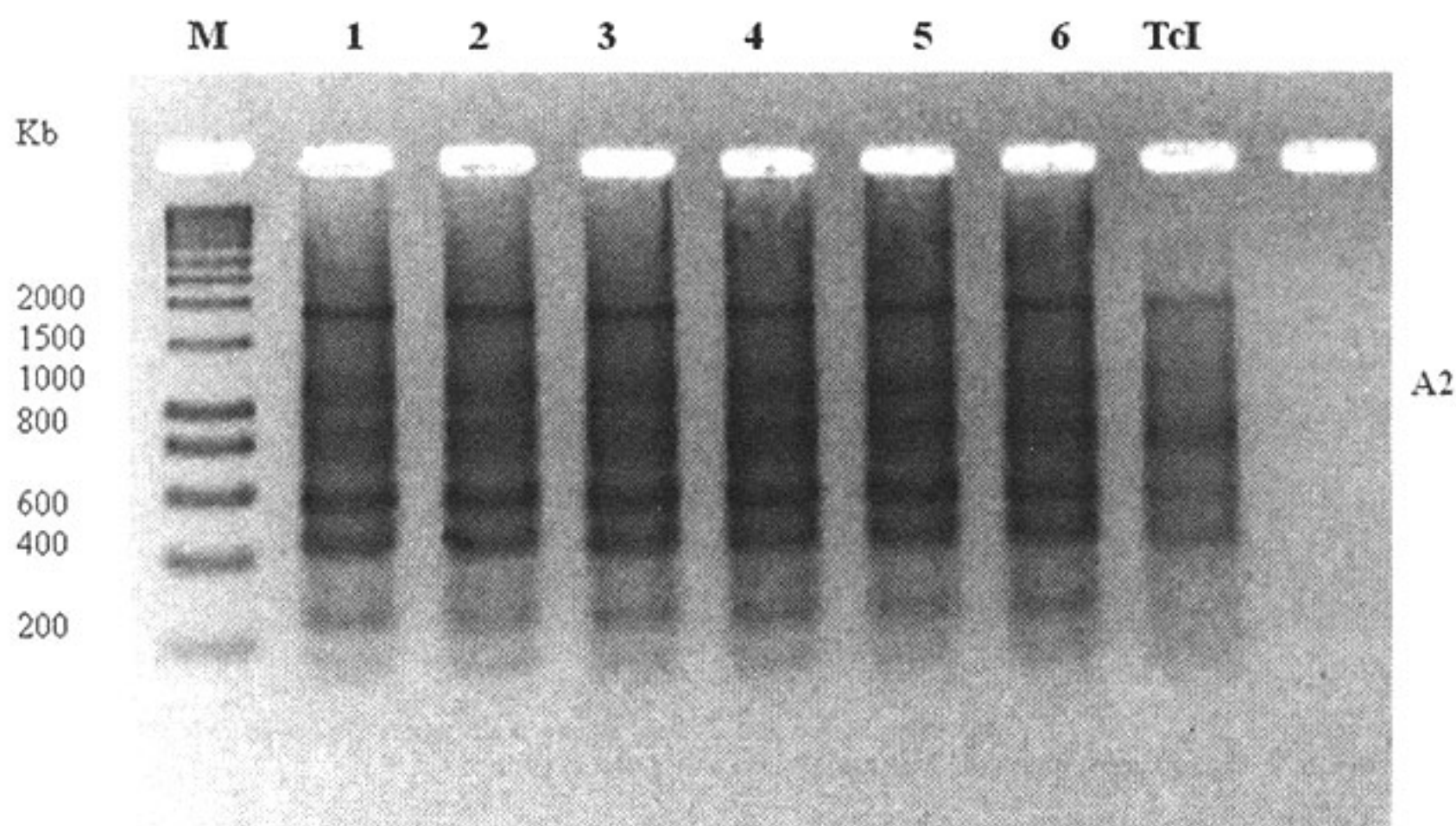
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X12914 con el primer A2

Figura 3. Perfil de bandas correspondiente al aislado X10968 con el primer A1. El primer carril M corresponde al marcador de peso molecular Hiperlader I. El carril 1 corresponde al aislado original. En los carriles del 2 hasta el 6 se encuentran ubicados los clones en estudio. El último carril corresponde a la cepa de referencia TcI.



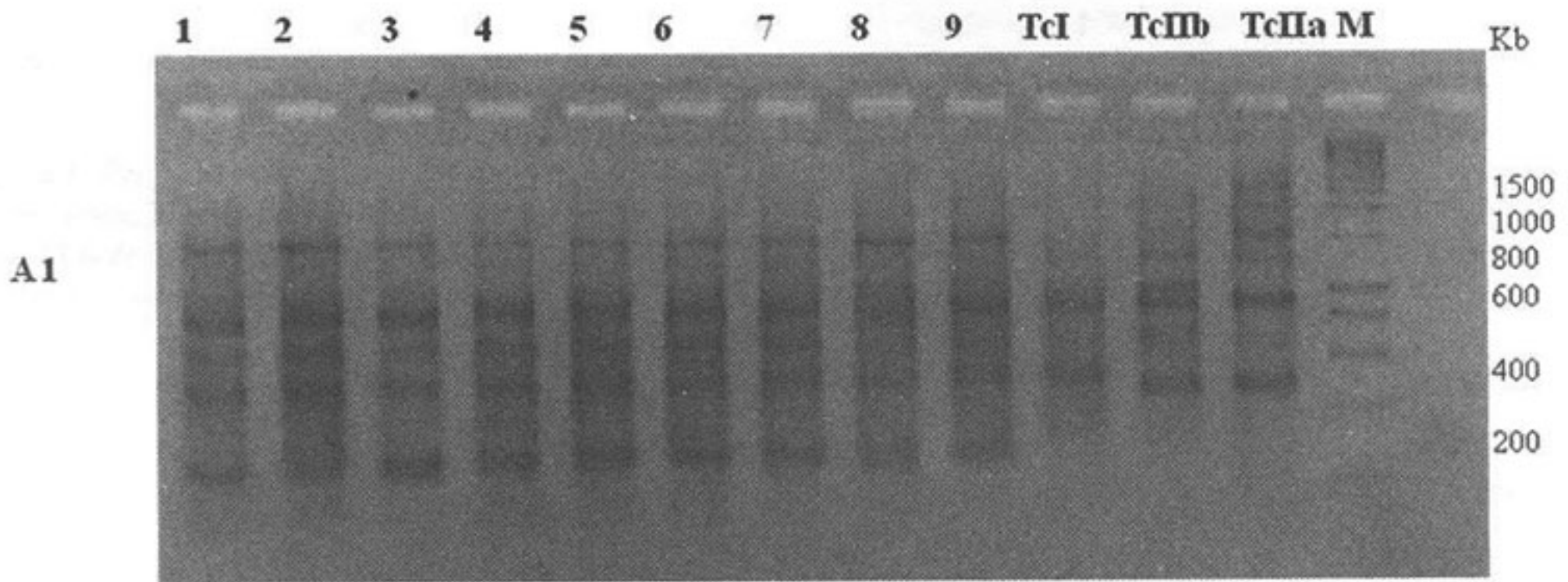
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X10968 con el primer A1

Figura 4. Perfil de bandas que corresponde al aislado X10968 con el primer A2. En el carril M se muestra el marcador de peso molecular Hiperlader I. El aislado original se encuentra en el carril 1; a partir de este se encuentran los clones derivados del mismo hasta el carril 6. En el último carril se encuentra la cepa de referencia TcI.



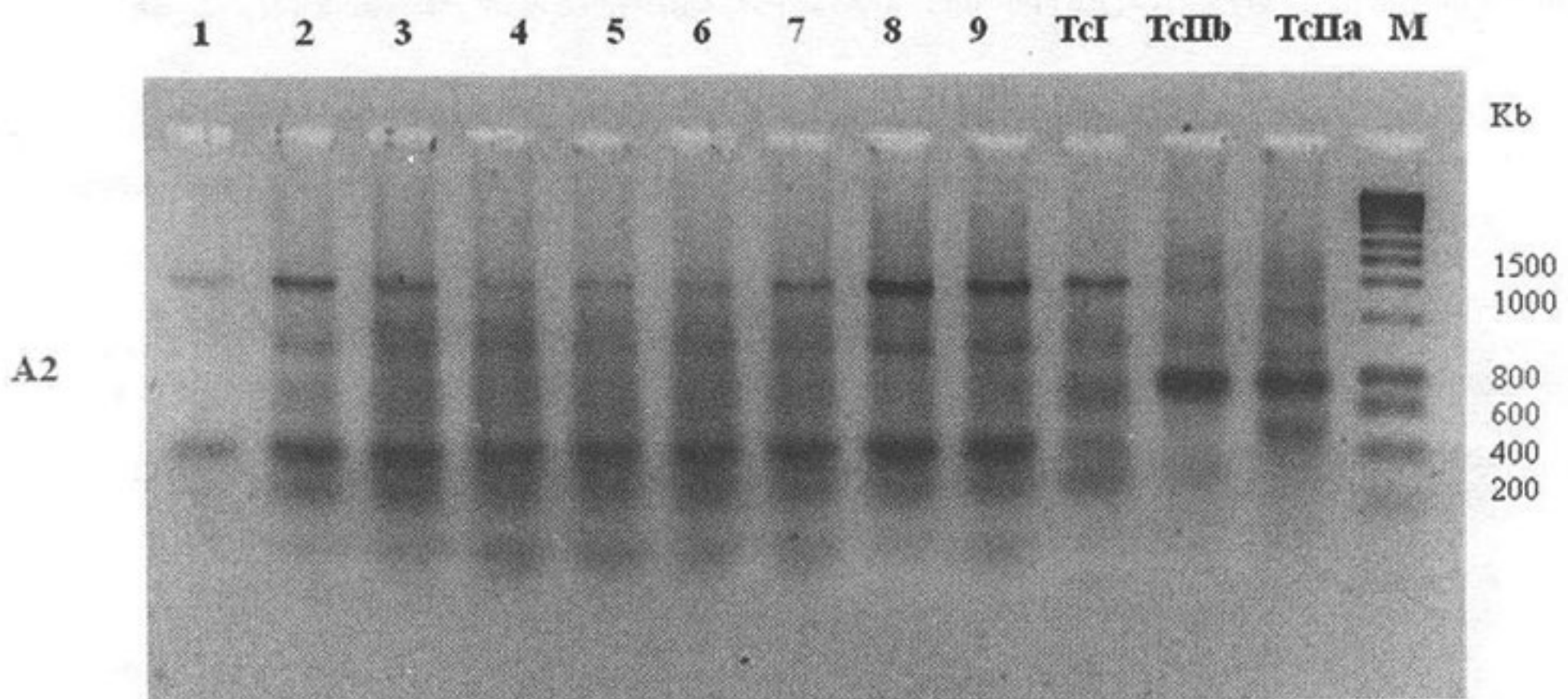
Productos de amplificación de aislado proveniente de humano: X10968 con el primer A2

Figura 5. Perfil de bandas correspondiente al aislado DMJ0108 con el primer A1. En el carril 1 se localiza el aislado original de donde se obtienen los clones ubicados en el gel desde el carril 2 hasta el 9. Seguidamente se observan las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa. En el último carril encuentra el marcador de peso molecular.



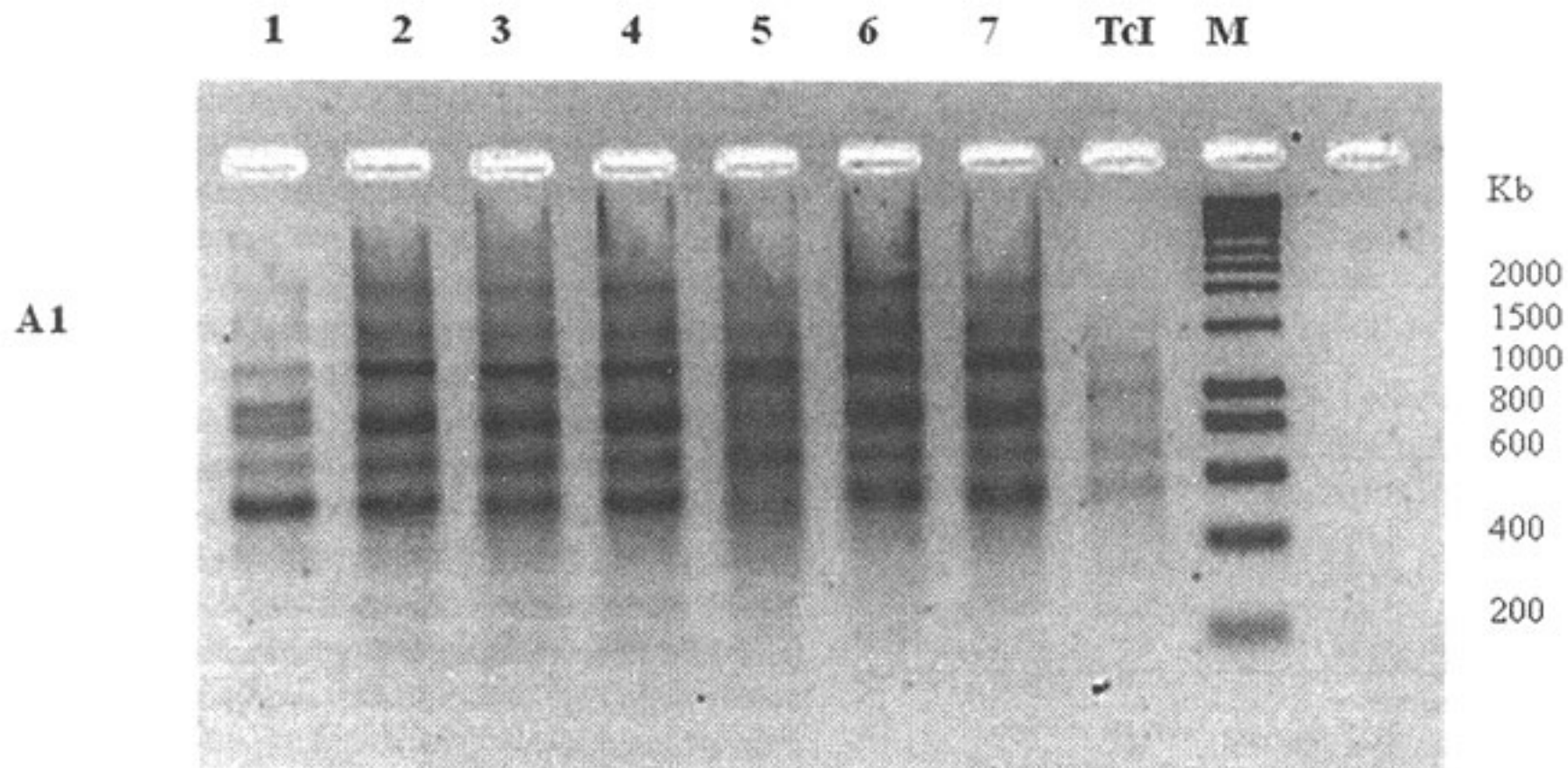
Productos de amplificación de aislado proveniente de Marsupial: DMJ0108 con el primer A1

Figura 6. Perfil de bandas correspondiente al aislado DMJ0108 con el primer A2. En el carril 1 se encuentra el aislado original, a partir de allí se ubican los clones que van desde el carril 2 hasta el 9. Las cepas de referencia TcI, TcIIb y TcIIa se encuentran seguidas de los mismos. En el último carril se ubica el marcador de peso molecular (Hiperlader I).



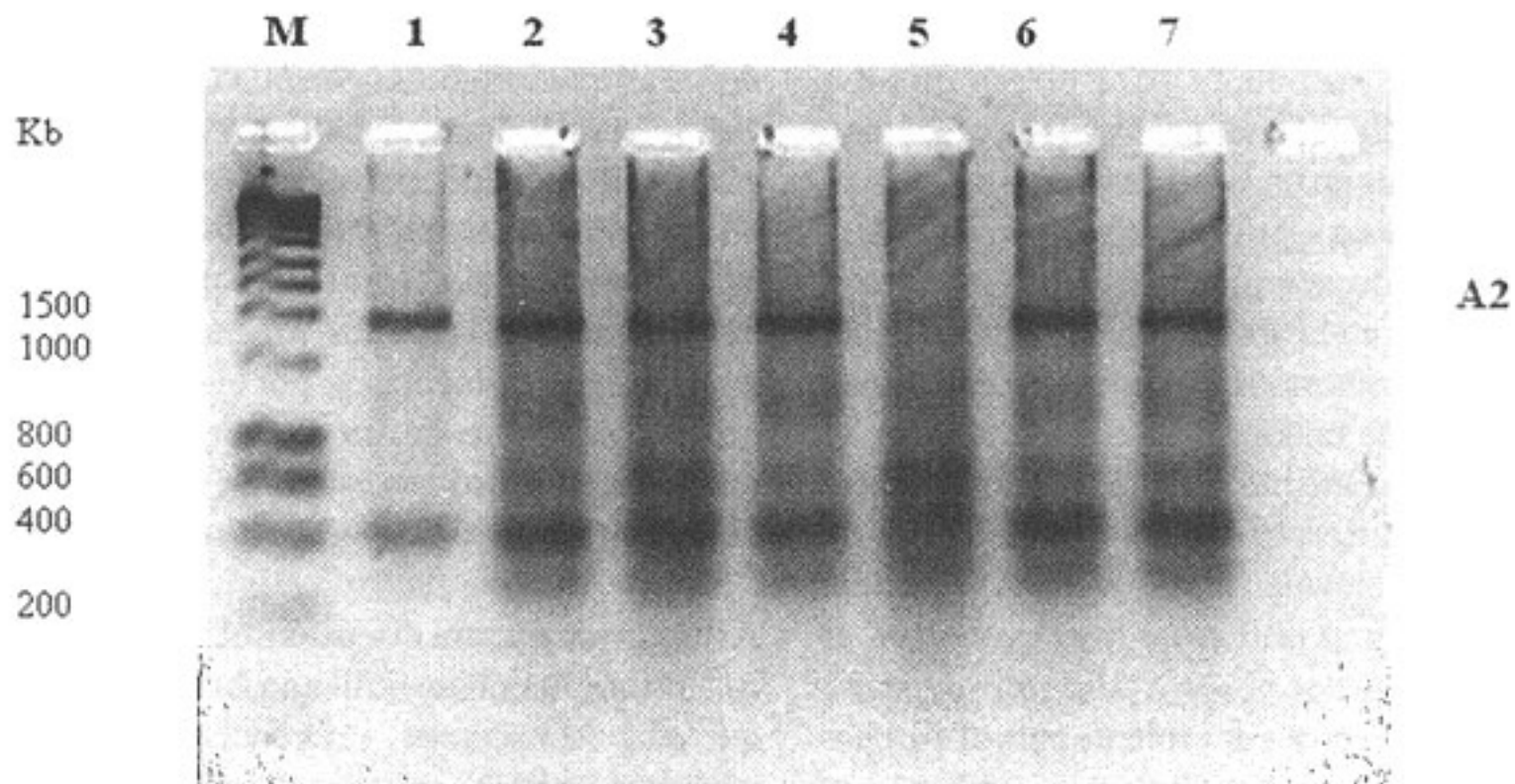
Productos de amplificación de aislado proveniente de Marsupial: DMJ0108 con el primer A2

Figura 7. Perfil de bandas correspondiente al aislado VE46708 con el primer A1. En el primer carril se ubica el aislado original y a partir de este hasta el carril 7 se ubican los clones originados del mismo. Luego se encuentra la cepa de referencia TcI, y en el último carril se localiza el marcador de peso molecular (Hiperlader I).



Productos de amplificación de aislado proveniente de Vector: VE46708: con el primer A1

Figura 8. Perfil de bandas correspondiente al aislado VE46708 con el primer A2. El carril designado con la M corresponde al marcador de peso molecular (Hiperlader I). En el carril 1 se ubica el aislado original, luego desde el carril 2 hasta el carril 7 se encuentran los clones derivados de este.



Productos de amplificación de aislado proveniente de Vector: VE46708: con el primer A2

Inicialmente, a través de la observación de geles se buscaron bandas bien definidas para establecer un criterio, que permitiese la elaboración de una matriz de datos de tipo 1-0, este paso es necesario para utilizar el programa estadístico Popgene versión 1.31. Los resultados generaron una variedad de índices para cada uno de los aislados (Tabla 3), que se

definen a continuación: (na) correspondiente al número de alelos observados, este indica la existencia de un alelo único, o mas de uno dependiendo de su valor. (h) índice de Variabilidad Genética de Nei's, el cual representa la probabilidad de que un locus con dos alelos elegidos al azar dentro de una población, sean diferentes el uno del otro. En

esta investigación fue un marcador importante, ya que fue el indicador de la variabilidad genética intra-poblacional en los aislados. Por último el programa expresa el Número de loci polimórficos que difieren entre individuos de una misma población y el porcentaje que esto representa. Todos estos índices estadísticos en conjunto fueron analizados, en búsqueda de la variabilidad genética dentro de cada aislado.

Tabla 3. Resumen estadístico de los índices de variabilidad genética para cada aislado.

Aislado	Media de na	Media de h	Número de Loci Polimórficos	Porcentaje de Loci Polimórficos
X12914	1.5000	0.1652	7	50.0%
X10968	1.2667	0.0853	4	26,67%
DMJ0108	1.0833	0.0312	1	8.33%
VE46708	1.0000	0.0000	0	0%

na= número de alelos observados

h= índice de variabilidad genética de Nei's.

Discusión

La base de esta investigación fue la clonación de los aislados mediante la técnica de plaqueo descrita por Yeo y col., (15). A pesar de que no existen muchos trabajos que respalden la utilidad de la misma, ésta logro ser efectiva ya que permitió la obtención de colonias perfectamente aisladas, fácilmente observables y en número suficiente para el estudio. La eficiencia de la técnica de plaqueo se extiende a la capacidad de sostenimiento de la colonia en un lapso de tiempo suficiente, para que ésta logre crecer hasta ser diferenciada con facilidad, además tiene la ventaja de ser relativamente sencilla y económica. Por otra parte, en la aplicación de la técnica de RAPD, se emplearon dos primers A1 y A2, esto con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar variabilidad entre el genoma de los clones de un mismo aislado. Dichos primers amplificaron fragmentos correspondientes a sitios de unión en donde encontraron complementariedad, según la secuencia de cada uno. Esta técnica permitió amplificar zonas en el genoma de *T. cruzi* en las cuales se observó polimorfismo entre los locus, lo que hizo a esta técnica conveniente para el estudio.

Visto esto, podemos decir que para el fin que perseguía la investigación, fue favorable no solo la aplicación de las técnicas de plaqueo y la de RAPD, sino su combinación, como lo hicieron Yeo y col. (2007), ya que se pudo demostrar la heterogeneidad existente en clones de un mismo aislado de *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos demostraron la existencia de heterogeneidad intra-poblacional, sin embargo esta

variabilidad genética se presentó en diferente grado en cada uno de los aislados, mostrando una mayor variabilidad genética entre los clones pertenecientes a los aislados provenientes del hombre, lo cual podría atribuirse al resultado de la relación parásito hospedero y al ambiente adverso al que se somete el parásito cuando hace infección en el hombre, ya que éste debe vencer desde su entrada las barreras naturales y posteriormente evadir el sistema inmune del individuo para poder establecer con éxito la infección. Quizás estos factores puedan influenciar cambios a nivel genético, para poder adaptarse a esas condiciones que no le son favorables, pudiendo quizás con ello conseguir algún tipo de ventaja adaptativa. En este caso fueron estudiados dos aislados, los cuales presentaron variabilidad genética en una proporción distinta, siendo el aislado X12914 el mas polimórficos de los dos; resulta llamativo el hecho de que el 50% de sus loci mostraron ser polimórficos. Quizás la explicación a este resultado, pueda de alguna manera estar relacionado con la virulencia del aislado, pero ello debe corroborarse en otras investigaciones en las cuales se trabaje con modelos experimentales utilizando los clones obtenidos.

En cuanto a los clones provenientes de marsupial, aunque la variabilidad genética obtenida fue baja, no debe ser despreciada, es necesario dirigir estudios en este sentido, que tratasen de explicar si se esta presentando algún cambio de este reservorio en la naturaleza. A diferencia de los demás aislados, el proveniente del vector, no presento variación entre sus clones, mostrando un patrón de bandas homogéneos. Cabe destacar que esta homogeneidad a la que se hace referencia, esta sujeta al número de individuos comparados en este aislado y a los primers utilizados, ya que quizás no se detectaron con ellos regiones las cuales presentasen variabilidad, por lo cual no puede ser descartada la posibilidad de que exista heterogeneidad entre los mismos. También este resultado pudiese estar influenciado por el origen del aislado, ya que el mismo proviene de un vector netamente silvestre, que probablemente no haya estado en contacto jamás con otro ciclo de transmisión y/o hospedador vertebrado.

A lo largo de nuestra discusión, el termino variabilidad genética ha sido ampliamente utilizado, sin embargo debemos conocer que cuando hacemos referencia al término de variabilidad genética, se hace enfoque a variaciones en la secuencia del genoma, por lo tanto en un amplio sentido el concepto de variabilidad se hace sinónimo de polimorfismo. Hoy en día este último es definido como la existencia simultanea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado. El polimorfismo afecta tanto regiones codificantes del genoma (polimorfismo génico) como no codificantes (polimorfismo general). En ambos casos puede ocurrir una variación en un par de bases, como en miles de pares de bases. La variabilidad genética puede ser el resultado

de un proceso de selección, mutación, migración y deriva genética. Sin embargo el polimorfismo resultante, podría tener distinta trascendencia desde el punto de vista funcional, dependiendo de si afecta a regiones no codificantes, reguladores o codificantes del genoma de *T. cruzi* y también del modo en que pueda afectar al mensaje genético de estas últimas (18). Bajo este concepto se podrían establecer hipótesis que tratasen de explicar el efecto que podría tener la heterogeneidad poblacional encontrada sobre el parásito y la relación que establece éste con su hospedero.

Estos resultados podrían ser altamente significativos, pero necesariamente deben ser sometidos a posteriores estudios que puedan sustentar la significancia de los mismos. Evidentemente, existe una variabilidad genética entre los clones derivados de un mismo aislado, pero a este nivel solo podemos limitarnos a reportar su existencia. Este podría ser el punto de partida para la realización de nuevos trabajos que pudieran relacionar estos datos con las implicaciones clínicas, epidemiológicas y biológicas del parásito propiamente dicho. Existen muchas interrogantes que no han sido esclarecidas en cuanto a la clínica de la enfermedad de Chagas y se piensa que podrían estar relacionadas con esta heterogeneidad en general que presenta el parásito, ya que algunos estudios han reportado tropismo diferencial de las cepas por los tejidos cuando el hospedero se infecta (1,9,19). Sería interesante saber si este tropismo se haya relacionado a la heterogeneidad de un aislado, sin excluir los factores genéticos intrínsecos al hospedador. También pudiesen hacerse futuras correlaciones entre la severidad en la que se puede presentar la enfermedad en diferentes individuos cuando se hayan infectados por un mismo aislado y la heterogeneidad encontrada en los clones. Estas interrogantes que surgen a partir de lo observado en este estudio, tiene como base la diferente proporción en la que se presenta heterogeneidad dependiendo del origen de los aislados estudiados.

Agradecimientos

Estudio financiado con fondos de FONACIT proyecto G-2005000827.

Referencias

1. Macedo A, Pena S. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today* 1998;14:119-124.
2. Macedo A, Pimienta J, Aguilar R, Melo A, Chiari E, Zingales, *et al.*: Usefulness of Microsatellite Typing in population Genetic Studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Oswaldo Cruz* 2001; 96:407.
3. Devera R, Fernandes O, Coura J. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting populations after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:1-12.

4. Miles M, Toye P, Oswald S, Godfrey D. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71:217-225.
5. Miles M, Souza A, Povoá M, Shaw J, Lainson R, Toye P. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978; 272:819-821.
6. Miles M, Lanham S, De Souza A, Pavoá D. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74: 221- 242.
7. Souto R, Fernandes O, Macedo A, Campbell D, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83:141-152.
8. Zingales B, Stolf B, Souto R, Fernandes O, Briones M. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:159-164.
9. Macedo A, Machado C, Oliveira R, Pena S. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2004; 99:1-12.
10. Guzmán E, Zaval J, Acosta K, Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomed* 1999;10:177-184.
11. Rojas M, Pinho A, Cuervo P, Alfaro F, Solano M, Samata X, *et al.* *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae): Ecology of transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology* 2006;114 305-313.
12. Añez N, Crisante G, Da Silva F, Rojas A, Carrasco H, Umezawa E, *et al.* Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas disease. *Trop. Med. Ins. Health* 2004; 9: 1319-1326.
13. Andrade, S. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94:185-187.
14. Magalhaes I, Souza M, Lima C, Andrade S. Infections of *Callosus* (Rodentia Cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: Pathogenicity, Histotropism, and fibrosis induction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:403-13.
15. Yeo M, Lewis M, Carraco H, Acosta N, Llewellyn M, Da Silva Valente S, *et a.* Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *International Journal for Parasitology* 2007; 37:111-120.
16. Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafaslski A, Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990;18: 6531-6535.
17. Carrasco H, Frame I, Valente S, Miles M. Genetic Exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1996; 54(4): 418-424.
18. Luque J, Herraes A. *Biología Molecular e Ingeniería genética*. Harcourt España, 2001. pag.469.
19. Mejías A, Triana O. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomedica* 2005; 25:76-66.



Clonamiento y expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* de la acuaporina 2 de *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2)

Silvana Verlezza^{1,2}, Catherine Figarella², José Luis Ramírez², Néstor L. Uzcátegui^{1,2,*}

Recibido: 7 Septiembre 2009; Aceptado: 25 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, una entidad endémica no controlada y en crecimiento en Latinoamérica. El parásito, durante su ciclo de vida, se ve sometido a cambios bruscos en la osmolaridad. Tales situaciones de estrés osmótico ameritan sistemas fisiológicos que le permitan a estas células adaptarse y sobrevivir a la nueva situación. En distintos organismos, uno de los elementos primordiales que interviene en osmorregulación son las acuaporinas, proteínas de membrana pertenecientes a la familia MIP ("major intrinsic protein"), que permiten el paso selectivo de agua (acuaporinas clásicas) y otras moléculas no cargadas (acuagliceroporinas) a través de membranas biológicas, en función de gradientes osmóticos. En el genoma de *T. cruzi* existen cinco genes que presentan similitud con proteínas de la familia MIP. Una de éstas ya ha sido caracterizada, TcAQP1 (*Trypanosoma cruzi*, acuaporina 1), un canal permeable solo al agua. En este artículo de investigación se inició el estudio de un segundo gen con similitud a acuaporina, al cual hemos denominado TcAQP2. El gen TcAQP2 codifica para una proteína de 276 aminoácidos. Por medio de herramientas de bioinformática se realizó la predicción de la estructura de dicha proteína; posee características que permiten ubicarla dentro de la familia MIP. Se realizó el clonamiento y secuenciación de la TcAQP2, detectándose diez mutaciones silentes. Este hecho sugiere que se trata de mutaciones propias de la cepa de *T. cruzi* CL Brener utilizada en el desarrollo experimental de este trabajo. Posteriormente se realizó el subclonamiento de TcAQP2 en el plásmido de expresión en el modelo de levaduras pYES.2 y se transformó en las células de *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión funcional de la TcAQP2 en dichas células, muestra evidencias de que esta proteína interviene en osmorregulación cuando las células son expuestas a choques hiper-osmóticos e hipo-osmóticos, lo que sugiere la participación de la acuaporina como canal para el transporte de agua y/o glicerol a través de la membrana de las levaduras. Igualmente se sugiere que esta acuaporina es capaz de transportar sustancias tóxicas como AsIII y metilglioxal, sin embargo son necesarios estudios profundos en otros modelos biológicos para confirmar este hecho. Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten concluir que esta proteína, expresada heterológicamente en *S. cerevisiae*, representa un canal de agua y/o glicerol que interviene en procesos de osmorregulación.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, acuaporina, proteínas integrales de membrana, osmorregulación.

Cloning and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the aquaporin 2 of *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2)

SUMMARY

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is prevalent throughout Latin America. During its life cycle, the parasite undergoes extreme fluctuations in osmolarity, consequently physiological systems are required to assure its survival. In many organisms one of the more important systems involved in osmoregulation are aquaporins. These proteins are members of the major intrinsic proteins family (MIP). Aquaporins can be divided in two groups according to its permeability: the first one is only permeable to water (orthodox aquaporins) and the second one is permeable to water, glycerol, and other small, uncharged molecules (aquaglyceroporins). In the *T. cruzi* genome there are 5 genes that encode proteins similar to aquaporins. One of these genes (*Trypanosoma cruzi* aquaporin 1, TcAQP1) has been already characterized as a channel that is only permeable to water. It was also demonstrated that TcAQP1 is involved in parasite osmoregulation. In this work, we started to investigate other gene with aquaporin similarity, which we named *Trypanosoma cruzi* aquaporin 2 (TcAQP2). The gene TcAQP2 encodes a protein of 276 aminoacids. The protein has six putative transmembrane domains and the two signature motifs asparagine-proline-alanine (NPA), which is the classical conserve motif in the MIP family proteins. Cloning and sequencing of the TcAQP2 gene allowed the detection of ten silent mutations in all clones analyzed, as compare to the sequence reported in data bank of the parasite, suggesting that they belong to the CL Brener strain used in this study. In order to analyze the TcAQP2 function, subcloning in the plasmid for heterologous expression in yeast (pYES.2) of this gene was performed. After transformation and functional expression of TcAQP2 in *Saccharomyces cerevisiae*, cells were exposed to osmotic stress. The results indicate that this protein is involved in osmoregulation, and suggest that TcAQP2 participate as a channel for water and/or glycerol in the yeast membrane. Additionally, experimental evidences suggest that this channel can transport toxic substances like AsIII and metilglioxal, however, experiments using other heterologous expression systems is required to confirm this fact. Taken together, we concluded that TcAQP2 expressed in *S. cerevisiae* represents a water and/or glycerol channel that is involved in osmoregulation processes.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, aquaporin, integral membrane proteins, osmoregulation.

* Solicitar copia a: nestor.uzcategui@ucv.ve.

1. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis.
2. Fundación Instituto reestudios Avanzados IDEA.

Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, la cual es una entidad endémica en amplio crecimiento en Latinoamérica. Se estima que la Enfermedad de Chagas afecta entre 8 y 11 millones de personas; estando en riesgo de infección aproximadamente 100 millones de personas y causando 14 mil muertes anuales, por lo que esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública con aparentes pocas posibilidades de solución a corto plazo. En la actualidad no existen drogas ni vacunas efectivas contra *T. cruzi* y el control de su vector esencialmente ha sido ineficiente (1). Las drogas medianamente eficaces que se usan en la actualidad fueron desarrolladas a mediados del siglo pasado y están basadas en un conocimiento empírico, por lo tanto, su modo de acción en la mayoría de los casos es desconocido (2).

La generación de conocimientos que permitan el entendimiento detallado de la bioquímica, fisiología y, en general, de la biología de *T. cruzi* favorecerá la identificación de moléculas esenciales para el parásito, que a su vez, sean diferenciales con su contraparte en el hospedero, permitiendo la identificación de nuevos blancos de drogas. En este sentido, proteínas de membrana resultan de particular interés por su accesibilidad en la célula. Entre estas proteínas figuran las acuaporinas; a pesar de su reciente descubrimiento se ha puesto de manifiesto su importancia en la quimioterapia de varias enfermedades causadas por protozoarios (3), en particular como vía de acceso a drogas (4).

El protozoario patógeno *Trypanosoma cruzi*, debe pasar durante su ciclo de vida por cambios bruscos en la osmolaridad de los medios en donde se desarrolla, ya sea en el intestino del insecto vector como en los fluidos intersticiales del hospedador al cual infecta. Estos cambios abruptos de las condiciones ambientales ameritan sistemas fisiológicos que le permitan a estas células adaptarse y sobrevivir a la nueva situación (5).

Las células de *T. cruzi*, cuando son expuestas a estrés hipo-osmótico, poseen mecanismos que intervienen en osmorregulación; principalmente la liberación de aminoácidos citosólicos, y en menor grado, de otros osmolitos como sodio, potasio, cloruro, inositol, metilamina y fosfatos. Sin embargo, son necesarios mecanismos complementarios para mantener el equilibrio osmótico del parásito, que permitan explicar la eficiencia de la respuesta que estas células muestran a cambios de osmolaridad (5).

Las acuaporinas son proteínas integrales de membrana ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas proteínas son canales que pueden transportar agua a través de los compartimientos celulares (Acuaporinas ortodoxas) y/o pueden

transportar glicerol y otras moléculas no cargadas (Acuagliceroporinas). A las acuaporinas se les han atribuido distintos roles biológicos de gran importancia, en el humano intervienen en la homeostasis del agua, la secreción lacrimal y de saliva, metabolismo de las grasas y del glicerol, mantenimiento de la transparencia del globo ocular, angiogénesis tumoral, transducción de la señal neuronal, entre otras (3). En los últimos años, han sido objeto de estudio en protozoarios como *Leishmania major* en donde se comportan como canales que permiten el paso de sustancias tóxicas al medio intracelular (6).

T. cruzi posee cinco genes que codifican para proteínas de la familia de las acuaporinas (www.genedb.com). En el año 2004, Rohloff y colaboradores, reportaron la existencia de la primera acuaporina de *T. cruzi* (TcAQP1), un canal exclusivo para agua ubicado en el complejo vacuola contráctil y en el acidocalcisoma del parásito. Cuando las células son expuestas a estrés hipo-osmótico, TcAQP1 interviene en la excreción de agua hacia el medio extracelular.

En el presente artículo de investigación se reporta la identificación, secuenciación y el clonamiento de la acuaporina 2 de *Trypanosoma cruzi* (TcAQP2), y se describe su expresión funcional en el sistema de *Saccharomyces cerevisiae*.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares

Trypanosoma cruzi: Se cultivaron epimastigotes de la cepa CL Brener en medio LIT, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y cultivados a 26°C.

Saccharomyces cerevisiae: la cepa BY4742 (Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0) se usó como control. Para estudios de fenotipo se empleó BY4742 con una delección para su acuaporina nativa Fps (Mat α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; YLL043:kanMX4). Ambas cepas se obtuvieron de Euroscarf Frankfurt, Alemania. Estas células se cultivaron a 30°C, regularmente en los medios estándar para levaduras: medio enriquecido YPD (de las iniciales en inglés Yeast Extract, Peptone, Dextrose) y medio de selección CM (Completed Minimal medium) (7).

Clonamiento de TcAQP2

Se aisló ARNm a partir de cultivo de *T. cruzi* en fase logarítmica, utilizando el kit RNAeasy (QIAGEN), posteriormente se obtuvo ADNc a partir del ARNm utilizando la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen); ambas metodologías acorde con las instrucciones de la casa comercial. Para la amplificación del gen TcAQP2 se realizó PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores: sentido ATA TCG ATA TGA CGG AGG AGG TTT TGG y



antisentido TCA TCG ATT TAC GAT CCG TAA AGA TGC, diseñados de acuerdo a la secuencia publicada en www.genedb.com (Tc00.1047053504159.40) y con sitios de restricción para la enzima ClaI. Se clonaron los productos de PCR en el plásmido pGEMT easy (Promega), se transformaron bacterias competentes *E. coli* "Top 10" (Invitrogen) con el constructo obtenido, pGEMT easy/TcAQP2, siguiendo protocolos estándar. Se verificó y confirmó la obtención de clones mediante PCR para amplificación de TcAQP2 en las colonias transformadas y análisis de restricción del constructo aislado de dichas colonias utilizando la enzima Cla I (New England Biolabs). El subclonamiento de TcAQP2 en el vector de expresión en levaduras pYES.2 (Invitrogen) se realizó posterior a la digestión con la enzima EcoRI de ambos el plásmido y el constructo pGEMT easy/TcAQP2. La ligación y transformación se realizaron por métodos estándar (7). Finalmente se verificaron los clones obtenidos mediante PCR y análisis de restricción utilizando la enzima BamHI.

Secuenciación de clones

Se realizó la secuenciación de clones obtenidos a través de electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM 3130/3130x (Genetic Analyzer Applied), utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en el cual se emplean terminadores fluorescentes, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se utilizaron para la amplificación de los fragmentos los oligonucleótidos cebadores M13 F y M13 R (Invitrogen), que reconocen secuencias del plásmido presentes en los flancos de TcAQP2; de esta manera se obtuvo la secuencia del clon presente en el constructo pGEMT easy/TcAQP2.

Transformación de levaduras *S. cerevisiae* y expresión de TcAQP2

La transformación de levaduras se realizó siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial del plásmido pYES.2 (Invitrogen), el cual posee un promotor para galactosa. La expresión de TcAQP2 en las células transformantes se realizó adicionando al medio CM-U (sin uracilo) este carbohidrato. La inducción se mantuvo durante toda la noche a 30°C.

Fenotipo de choque hiper-osmótico y de transporte de compuestos tóxicos

Luego de realizar la inducción de la expresión de TcAQP2 en el sistema de levaduras, se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10 de los cultivos. Estas diluciones se sembraron en placas de medio CM-U (selección de levaduras con el constructo) con galactosa (mantenimiento de la inducción) conteniendo: 3% NaCl; 0,8 M de sorbitol; 0,5 mM de AsIII o 1 mM de metilglioxal. Se incubaron por 48 horas a 30°C y se observaron los fenotipos obtenidos.

Fenotipo de choque hipo-osmótico

Con el fin de obtener protoplastos las células transformadas fueron cultivadas hasta su fase logarítmica en presencia de galactosa e incubadas con la enzima liticase por 4 horas a 30°C en constante rotación (7). Posteriormente se realizó el choque hipo-osmótico disminuyendo la osmolaridad de la solución en un 50% utilizando agua destilada. El cambio del volumen de los protoplastos se registró inmediatamente después del choque a una longitud de onda de 600 nm durante 90 segundos.

Herramientas de bioinformática

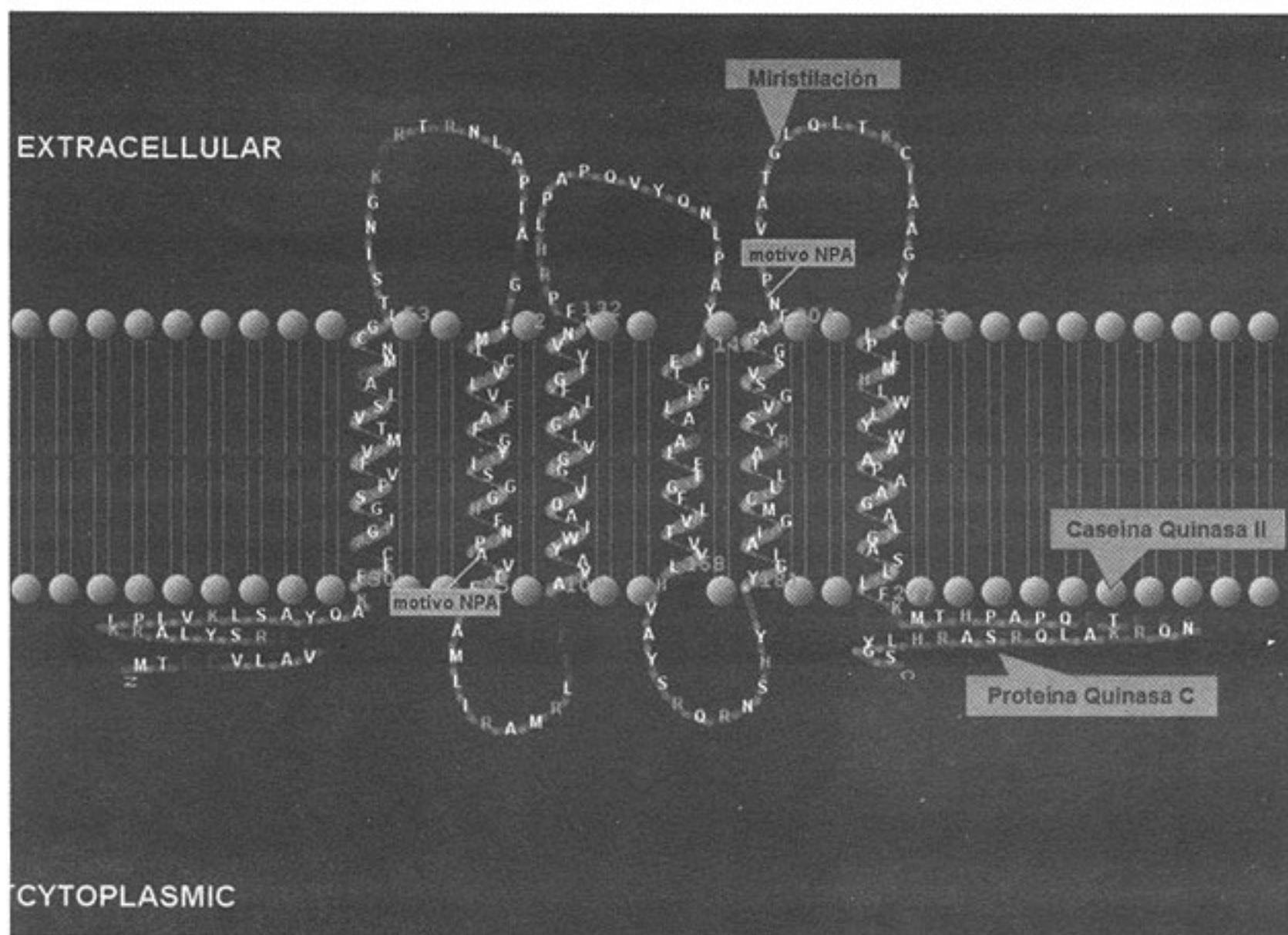
La secuencia del gen se obtuvo del servidor www.genedb.com. La manipulación de la secuencia se realizó con el software DNAMAN. Los dominios Transmembrana se calcularon utilizando el sitio <http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html> y la representación de la proteína en la membrana se obtuvo de <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/> respectivamente. Los sitios putativos de miristilación, caseína quinasa y proteína quinasa C fueron identificados en la dirección electrónica <http://us.expasy.org/prosite>.

Resultados

Análisis de la secuencia de la proteína TcAQP2

Se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de *Trypanosoma cruzi* para identificar secuencias que tuviesen suficiente similitud con acuaporinas de otros organismos. Se obtuvo 5 secuencias, una de las cuales está reportada en la literatura *TcAQP1* y caracterizada como una acuaporina ortodoxa (8) de las restantes se seleccionó la secuencia Tc00.1047053504159.40 (de acuerdo a www.genedb.com) que presenta un número importante de características de la familia MIP, a la cual pertenecen las acu(glicero)porinas, y se le denominó *TcAQP2*. Utilizando herramientas de bioinformática se realizó la predicción de los dominios Transmembrana de la proteína TcAQP2, codificada por este gen, y su representación en dos dimensiones (Figura 1). El gen consta de 831 pb y codifica para una proteína de 276 aminoácidos con extremos C- y N-terminal libres claramente definidos. Como se mencionó anteriormente, la proteína putativa TcAQP2 muestra las características propias de los miembros pertenecientes a la familia de acuaporinas: seis hélices Transmembrana unidas por cinco lazos conectores y las dos secuencias consenso altamente conservadas en esta familia, asparagina-prolina-alanina (NPA). TcAQP2 posee sitios putativos de modificaciones post-transduccionales: miristilación en la posición 210, fosforilación de caseína quinasa II en el triptófano ubicado en la posición 257 y proteína quinasa C en la serina 269 (Figura 1), sitios conocidos que juegan un rol importante en el plegamiento y regulación de la actividad biológica de las proteínas en general.

Figura 1. Predicción de la estructura bidimensional de TcAQP2 utilizando el servidor [http:// bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/](http://bioinformatics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/). Predicción de Hélices Transmembranales, Motivos NPA, Sitios de Fosforilación y Miristilación.



Clonamiento de TcAQP2

Se estandarizó el PCR para la amplificación del gen *TcAQP2*. Las condiciones que mostraron los mejores resultados fueron: 200 ng de ADNc, 1 μ M de cebadores y 45°C de temperatura de hibridación (Figura 2A). Posterior a la estandarización se realizó una reacción de ligación con el producto de PCR y el plásmido de clonamiento pGEMT easy (Promega). Se realizó la transformación en células competentes *E. coli* y los clones obtenidos se verificaron por medio de PCR directamente de las colonias transformantes por amplificación del gen *TcAQP2* (Figura 2B). Se obtuvieron tres colonias positivas. Igualmente se verificaron los clones por medio de análisis de restricción utilizando la enzima Cla I, obteniendo el patrón de bandas esperado para las tres colonias que resultaron positivas en el PCR; aproximadamente 831 pb para el gen y 3015 para el plásmido PGMT-easy (Figura 2C).

Secuenciación de clones

Se realizó la secuenciación de los clones, con el fin de conocer la composición de nucleótidos exacta del gen y, adicionalmente, descartar constructos con errores en la secuencia introducidos por la ADN polimerasa utilizada en la técnica de PCR. Luego de analizar tres de los clones obtenidos se observó que las secuencias de los mismos son idénticas, a su vez, presentaron 10 mutaciones únicas puntuales, al compararlas con el gen reportado en la base de datos del parásito. Las mutaciones encontradas fueron: C24G,

T55C, C58T, C96T, G99A, C153T, C161T, C417T, C432T Y C807T (Figura 3). Sin embargo todas estas mutaciones son silentes puesto que la traducción a proteína genera la misma secuencia de aminoácidos tanto para la *TcAQP2* clonada como para la reportada en el proyecto genoma.

Subclonamiento de TcAQP2 en el plásmido de expresión en *Saccharomyces cerevisiae* pYES.2.

Para estudiar la proteína codificada por el gen *TcAQP2* se realizó el subclonamiento de este gen en plásmido de expresión en levaduras pYES.2. Se verificaron los clones mediante amplificación de *TcAQP2* por PCR en colonias de bacterias transformadas. La mayoría de los clones evaluados presentaron una banda en el peso molecular que corresponde a *TcAQP2* (Figura 4A). De estos clones positivos se escogieron al azar cinco y se le realizó un análisis de restricción utilizando la enzima BamHI, con lo cual se confirmaron los clones y, además, se verificó a la dirección del gen en el plásmido, para garantizar su expresión. Cuando el gen está en la dirección correcta la digestión con esta enzima genera dos fragmentos, uno de 6401 pb y otro de 130 pb, mientras que en el caso incorrecto los tamaños de los fragmentos son 730 pb y 5700 pb. De los cinco clones se obtuvo uno con un constructor con inserción correcta (Figura 4B), este se utilizó para transformar levaduras y estudiar la función de la proteína en este modelo biológico.

Figura 2. Clonamiento de TcAQP2 A.- Gel de agarosa mostrando amplificación de *TcAQP2* por PCR a partir de ADNc de epimastigotes de *T. cruzi* B.- PCR de colonias para demostrar transformantes con el constructo pGEM-Teasy/*TcAQP2*. C.- Análisis de restricción (enzima *Cla*I) para la confirmación de los clones portadores del constructo pGEM-Teasy/*TcAQP2*. M: marcador; 1, 2, 3 y 4 corresponden a cuatro de las colonias que fueron tomadas al azar.

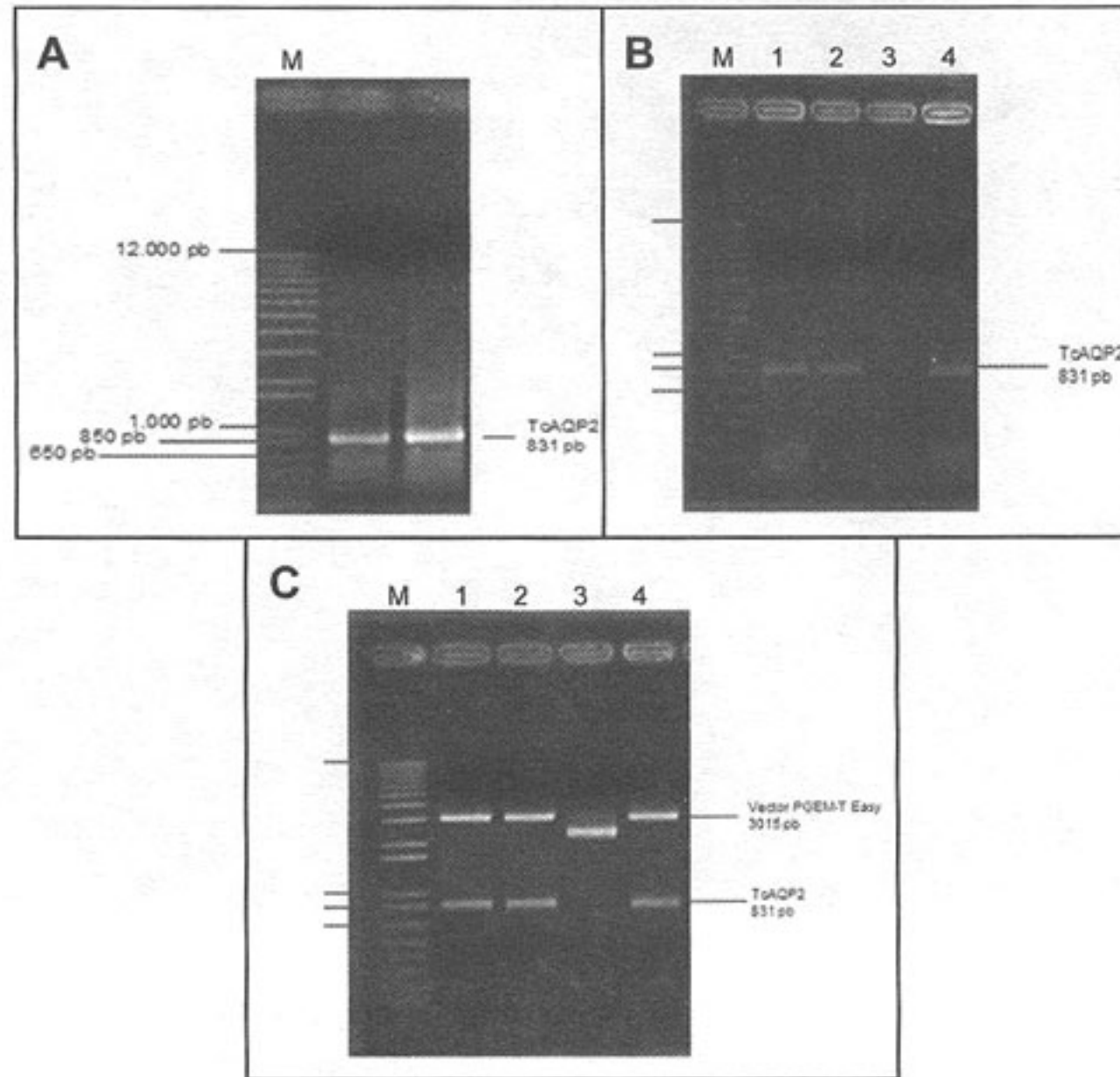


Figura 3. Secuenciación del Gen *TcAQP2* clonado, comparación con el gen reportado en el proyecto genoma de *T. cruzi*. Se observaron 10 mutaciones silentes que no cambian la secuencia de la proteína.

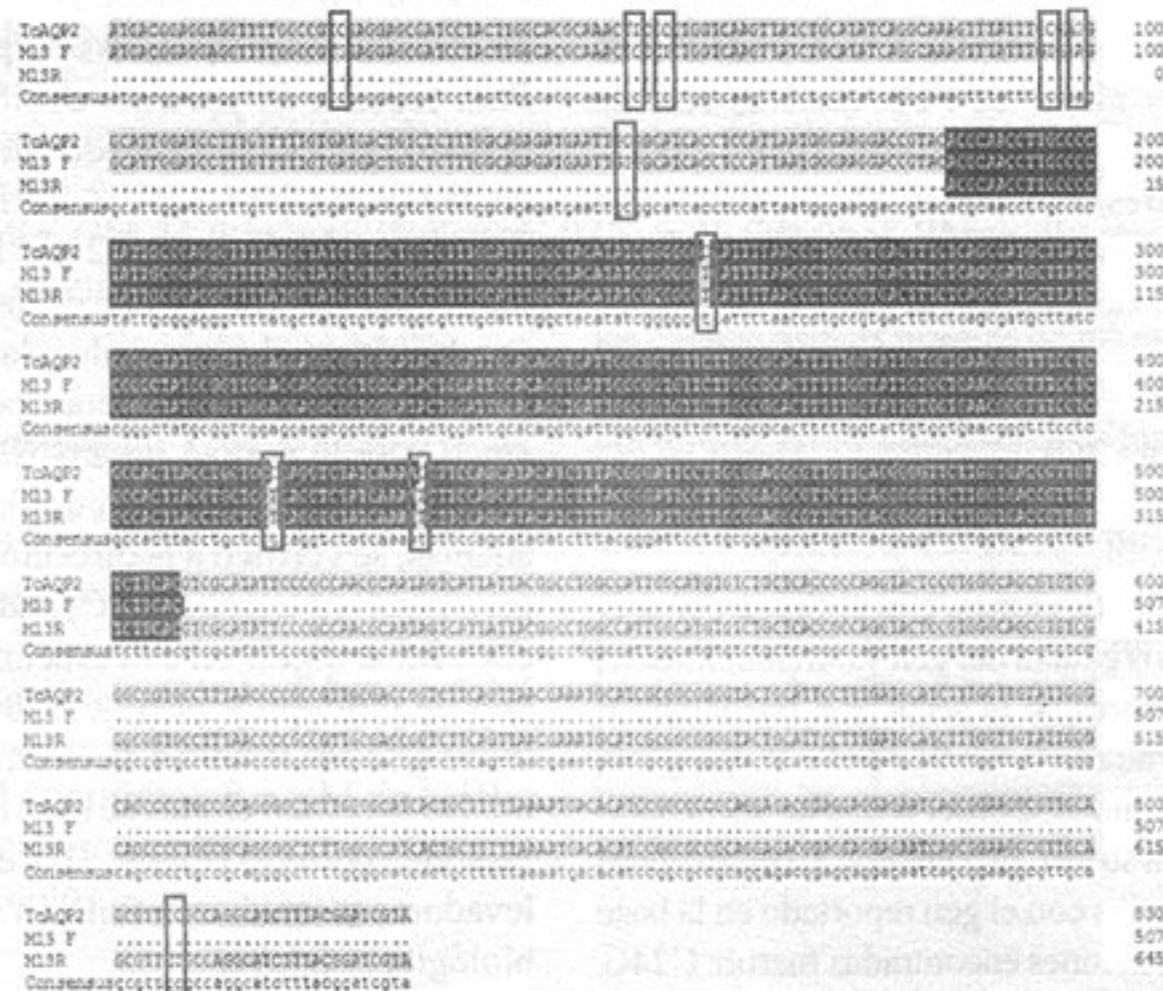
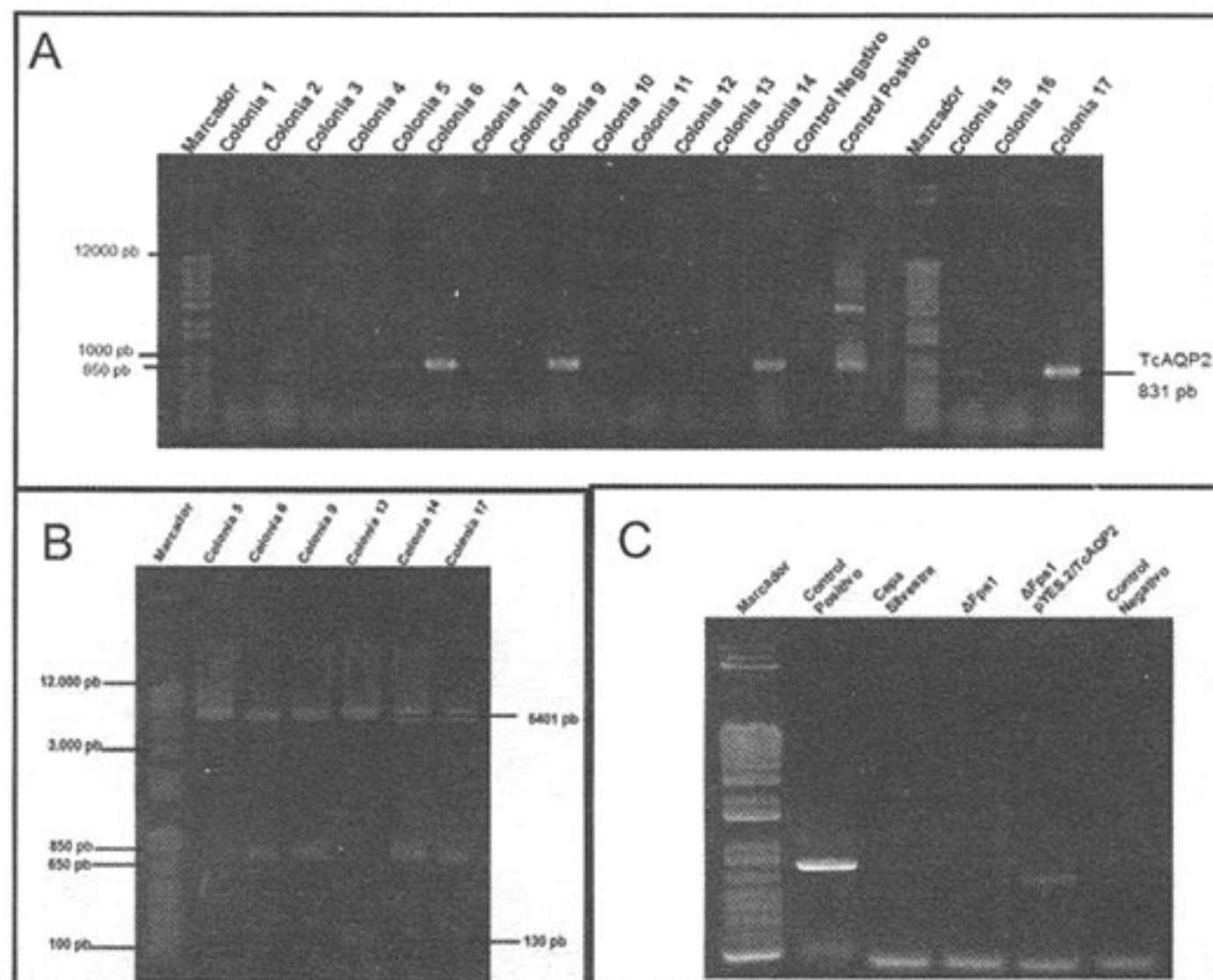


Figura 4. Subclonamiento de TcAQP2 en plásmido de expresión en levaduras pYES.2 A.- PCR de colonias para identificar transformantes. B.- Análisis de restricción (enzima BamHI) para confirmar los clones portadores del constructo PYES.2/TcAQP2 C.- Amplificación de la secuencia de TcAQP2 a partir de ADNc de levaduras transformantes. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carriles de izquierda a derecha: 1) marcadores de peso molecular, 2 Control positivo, ADN de *T. cruzi*, se observa una banda que corresponde al gen *TcAQP2*. 3y4 Cepa silvestre y mutante Δ Fps1 transformadas con pYES.2, respectivamente, no presento amplificación. 5 Cepa mutante Δ Fps1 con el constructo pYES.2/TcAQP2, se observa banda que corresponde al gen *TcAQP2*. 6 Control negativo, amplificación sin el uso de algún molde de ADN.



Transformación del constructo pYES.2./TcAQP2 en *Saccharomyces cerevisiae* y evaluación de la expresión del gen *TcAQP2*

Se transformó la cepa silvestre de *S. cerevisiae* con el plásmido pYES.2, como un control, para observar el comportamiento fisiológico de la cepa. Igualmente, la misma cepa pero con una delección de su acuaporina nativa (Δ Fps1) se transformó con el plásmido pYES.2, como un control experimental, para observar el comportamiento de la cepa sin la acuaporina. Finalmente, esta última cepa se transformó con el constructo pYES.2/TcAQP2, con el objeto de evaluar si TcAQP2 es una acuaporina y si interviene en osmoregulación, a través de la comparación con los controles anteriormente señalados. Antes de realizar los experimentos se verificó la expresión del gen *TcAQP2* mediante el aislamiento de ARNm de las levaduras, luego de la inducción de su expresión utilizando galactosa. Se realizó la síntesis del ADNc y posteriormente PCR para el gen de *TcAQP2*. Los resultados muestran la amplificación de TcAQP2 únicamente en la cepa que fue transformada con el constructo pYES.2/TcAQP2 (Figura 4C) lo cual indica que el sistema de expresión heteróloga esta funcionando y que los cambios observados en los distintos fenotipos se deben a la expresión de la proteína TcAQP2.

Choque hiper-osmótico

Se realizó el fenotipo en células de levadura induciendo choques hiper-osmóticos. Se cultivaron las levaduras transformadas en medio líquido CM-U, en presencia de galactosa, aproximadamente 16 horas, luego de lo cual se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en en placas de agar CM-U galactosa, en presencia (condición experimental) y ausencia (condición control) de diferentes osmolitos.

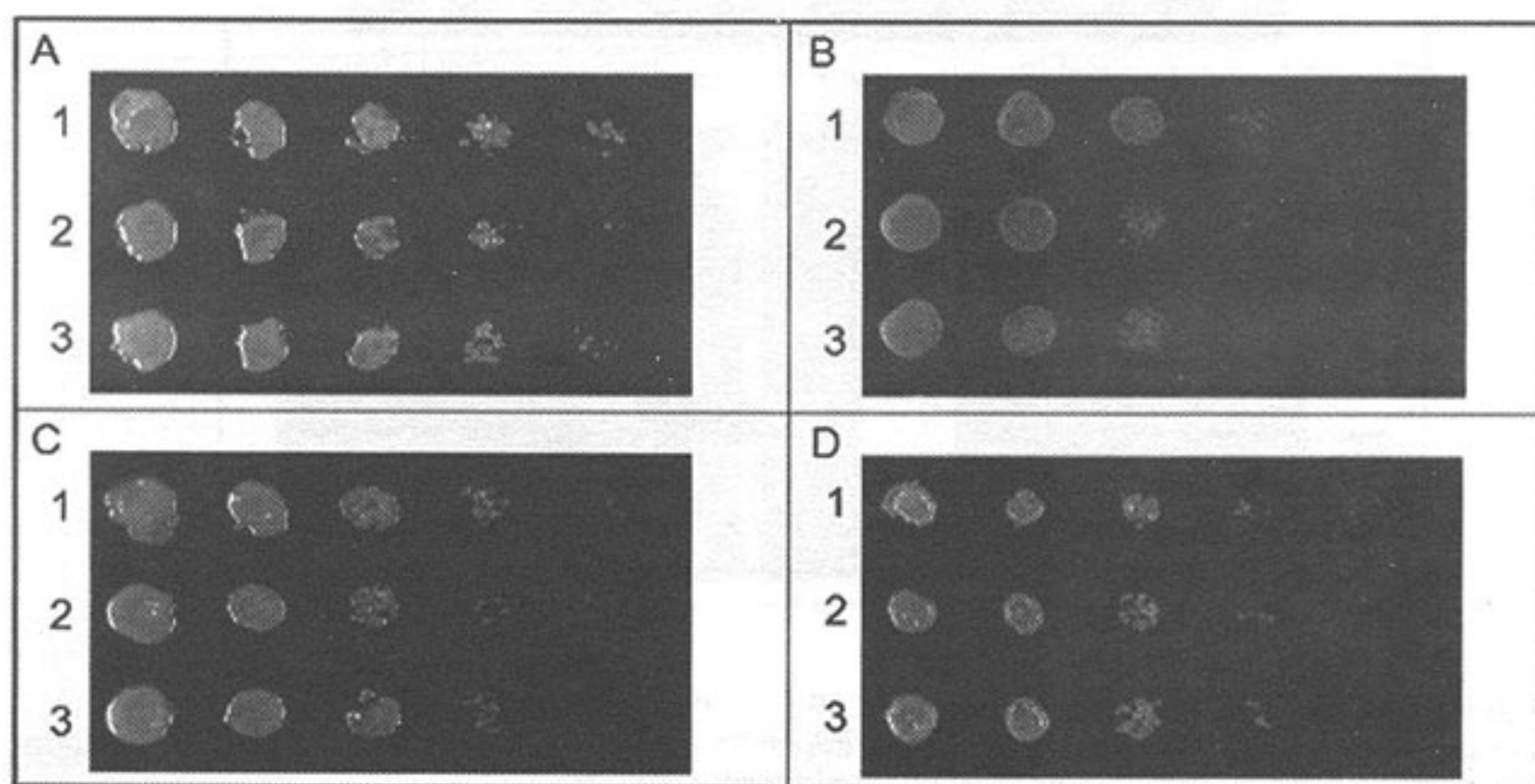
Saccharomyces cerevisiae, posee una acuagliceroporina, Fps1, que está involucrada en osmoregulación a través del transporte de glicerol. En condiciones de hiperosmolaridad, las levaduras evitan la pérdida de agua acumulando glicerol en el medio intracelular para aumentar la osmolaridad interna y compensar el estrés hiperosmótico. Se postula que dicha acumulación ocurre por la activación de enzimas que intervienen en la biosíntesis de glicerol, por la estimulación de la vía glicolítica y finalmente cerrando el canal de glicerol Fps1, para evitar el escape de este compuesto hacia el medio extracelular (9).

Bajo condiciones control, iso-osmótica, en medio CM-U con galactosa, todas las células crecen sin dificultades. Cuando

las células se sometieron a choque hiper-osmótico con NaCl 3%, la cepa silvestre control, creció sin inconvenientes en el medio, ya que como se describió anteriormente, el canal Fsp1 se cierra y evita la salida de glicerol permitiendo así el crecimiento de la célula (9). La cepa mutante Δ Fsp1 no posee su acuagliceroporina, y por lo tanto, el glicerol no podrá salir de la célula, en consecuencia, las levaduras crecen normalmente en el medio. En el caso de las células transformantes mutantes Δ Fsp1 que expresan la TcAQP2, se espera que ésta, siendo un canal para agua/glicerol, se encuentre constitutivamente en su estado abierto, debido a que es una expresión heteróloga y la levadura no presenta los mecanismos necesarios para controlar

un canal proveniente de otro organismo (10). En consecuencia levaduras expresando un canal de este tipo deben presentar alguna dificultad para crecer en condiciones hiper-osmóticas. De hecho, en la Figura 5A se observa, que las células transformantes mutantes Δ Fsp1 que expresan la TcAQP2 muestran claramente una tasa de crecimiento ligeramente menor a las mutantes Δ Fsp1 que no la expresan (Figura 5A, líneas 2 y 3), el mismo fenotipo se reprodujo usando sorbitol como osmolito (resultados no mostrados). Ello nos sugiere que TcAQP2 es un canal que interviene en el transporte de agua y/o glicerol, y que además, su función esta relacionada con osmorregulación.

Figura 5.- Fenotipo de células mutantes Δ Fsp1 expresando TcAQP2. A: Condición control sin estrés osmótico o tóxico (Medio CM-U con galactosa). B: Choque hiperosmótico con NaCl 3%. C: En presencia de Metilglioxal 1 mM. D: En presencia de AsIII 0,5 mM. Línea 1, cepa silvestre control (Transformada con pYES.2). Línea 2, cepa mutante Δ Fsp1 (Transformada con pYES.2). Línea 3 cepa mutante Δ Fsp1 (Transformada con pYES.2/TcAQP2).



Transporte de compuestos tóxicos por TcAQP2

El Arsénico (As) y el Antimonio (Sb) son compuestos tóxicos que han sido la base química de quimioterapéuticos contra Trypanosomatideos durante años (6). El tratamiento de la Enfermedad del Sueño se basa en un compuesto de arsénico orgánico y en el caso de la Leishmaniasis, se utilizan drogas que contienen antimonio. Resulta interesante que algunas acuagliceroporinas son capaces de transportar SbIII y AsIII, un ejemplo de ellas lo constituye la acuagliceroporina 1 de *Leishmania major* (LmAQP1) (4). Adicionalmente, LmAQP1 posee una alta permeabilidad al metilglioxal (6). Por esta razón AsIII y metilglioxal fueron incluidos en el análisis del fenotipo de TcAQP2, con la finalidad de contribuir con la definición del patrón de permeabilidad de esta proteína y mostrar la importancia farmacológica de las acuaporinas como vía de acceso a drogas.

En general a ciertas concentraciones, el AsIII y el metilglioxal son compuestos tóxicos para todas las células, por lo tanto si

se transportan al interior de las mismas, en este caso al interior de las levaduras, se esperaría un crecimiento disminuido en el medio conteniendo estos compuestos. Como se puede observar en la Figura 5 (Parte C y D), las células mutantes Δ Fsp1 expresando la TcAQP2 presentan diferencias menores en su crecimiento con respecto a la mutante Δ Fsp1 con el plásmido pYES.2 solo. Este resultado sugiere que esta proteína podría ser capaz de transportar compuestos tóxicos hacia el interior celular, sin embargo este hecho debe ser confirmado utilizando otros sistemas de expresión.

Choque hipo-osmótico

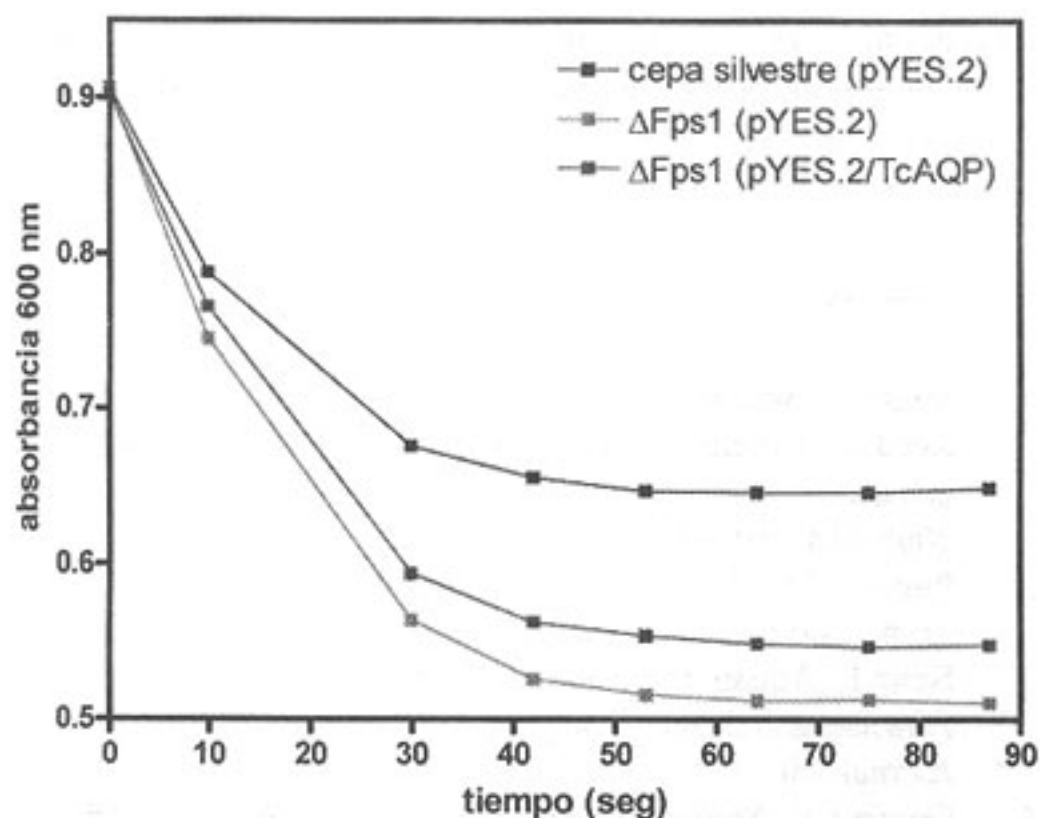
Con el objeto de definir aún más si TcAQP2 está involucrada en osmoregulación, se realizaron experimentos de choque hipo-osmótico. Las células transformadas y tratadas con lincasa (para eliminar su pared celular), fueron expuestas a choque hipo-osmótico. El estrés osmótico se provocó al disminuir la osmolaridad de la solución donde se encontraban los

protoplastos de 1 M a 0,5 M de Sorbitol, esto trae como consecuencia el transporte de agua hacia el interior de los protoplastos causando un incremento de volumen de los mismos. El registro del aumento de volumen fue monitoreado a 600 nm durante 90 segundos y se evidenció por un descenso en la densidad óptica medida. El valor inicial de la densidad óptica fue ajustado a 0,9 para todos los transformantes.

Cuando las levaduras son expuestas a estrés hiposmótico en primer lugar ocurre entrada de agua hacia el medio intracelular, y luego se activa el mecanismo de osmorregulación por medio de la Fps1, a través de la cual se transporta glicerol hacia el medio extracelular para compensar de esta manera la osmolaridad (11).

La cepa mutante DFps1 no posee el mecanismo de la acuagliceroporina para compensar el choque hiposmótico, por lo que el descenso de la densidad óptica es mucho mayor que en el caso de la cepa silvestre (Figura 6). La presencia de la TcAQP2 en la cepa mutante DFps1 permite responder más favorablemente al choque hipo-osmótico controlando el incremento del volumen de estos protoplastos, esto se evidencia en la Figura 6 en donde se observa que el descenso de la densidad óptica de la cepa mutante DFps1 que expresa la TcAQP2 es menor al descenso de la cepa mutante DFps1, complementando parcialmente la función de la acuagliceroporina Fps 1 ausente en la levadura. Este resultado corrobora los experimentos de choque hiper-osmótico e indica que la TcAQP2 interviene en el mecanismo de osmorregulación en el sistema de *Saccharomyces cerevisiae* a través del transporte de agua y/o glicerol.

Figura 6. Respuesta a estrés hiposmótico de protoplastos de *S. cerevisiae*. El experimento representa uno de tres experimentos que mostraron la misma tendencia y se realizaron como descrito en materiales y métodos.



Discusión

En el genoma de *T. cruzi* existen cinco genes con similitud a secuencias de la familia MIP. Hasta la fecha sólo se ha expresado funcionalmente y estudiado la acuaporina 1 de *T. cruzi* (5,8). TcAQP1 es una acuaporina ortodoxa con baja permeabilidad al agua que, sin embargo, tiene un rol fundamental en la osmorregulación del parásito. *T. cruzi* cuenta con 4 genes más que codifican para acuaporinas putativas y que no han sido estudiados, por lo que resulta de gran interés definir la función e importancia farmacológica de estas proteínas en el parásito. En el presente trabajo de investigación se inició la caracterización de la TcAQP2, a través de su clonamiento y expresión funcional en el modelo de *S. cerevisiae*, con el objeto de definir si esta proteína es una acu(glicero)porina y si ésta participa en procesos de osmorregulación.

El gen *TcAQP2* codifica para una proteína con características que permiten ubicarla dentro de la familia de las acuaporinas. Además posee sitios putativos para fosforilación de tipo Caseína quinasa II y Proteína quinasa C, los cuales podrían estar involucrados en la regulación de la función de esta proteína (12,13). Adicionalmente, posee un sitio putativo para miristilación, el cual podría tener un importante rol en la estabilidad de la proteína en la bicapa lipídica.

El gen que codifica para TcAQP2 se clonó y se secuenció. Se evaluaron tres de los clones obtenidos, todos presentaron la misma composición nucleotídica. Al comparar la secuencia obtenida con la reportada en el genoma de *T. cruzi* se observaron diez mutaciones puntuales en la secuencia, de carácter silente que no cambian la composición de los aminoácidos de la TcAQP2 con respecto a la secuencia que está reportada en el genoma de *T. cruzi* (www.genedb.org). Debido a que las mutaciones detectadas se encuentran en todos los clones secuenciados se descarta la posibilidad de errores producidos por la enzima polimerasa utilizada, se trata de mutaciones propias de la cepa de *T. cruzi* CL Brener que se utilizó en el desarrollo experimental de este trabajo.

La TcAQP2 fue expresada funcionalmente en mutantes DFps1 de *S. cerevisiae*. La evidencia experimental que soporta este hecho se basa en la demostración de: A) la expresión específica de su ARN mensajero, observada a través de la amplificación por PCR con cebadores específicos B) la expresión de la proteína codificada por *TcAQP2*, comprobada indirectamente por los estudios fenotípicos.

Las acuaporinas son proteínas de membrana que intervienen en un sin número de funciones, entre las que se cuentan, migración celular; hAQP3 (14), LmAQP1 (6), también como sillar estructural; hAQP0, en el metabolismo del glicerol;

hAQP3 y hAQP7. Sin embargo, la función más estudiada de estas proteínas de membrana y la que refleja mejor su vínculo con sus propiedades de permeabilidad es la participación en osmoregulación y en el mantenimiento de la estructura celular. Por tal motivo se inició el estudio de la función de TcAQP2 a través de experimentos que pudieran evidenciar la participación de la misma en estos procesos. Las levaduras que se encuentran expresando la TcAQP2 mostraron un fenotipo tanto en condiciones hiper-osmóticas como hipo-osmóticas. En condiciones hiper-osmóticas, aunque tenue, el crecimiento de estas levaduras fue afectado, lo cual representa un fenotipo característico de las acuaporinas heterológicamente expresadas, en razón de que ellas no son reguladas por las levaduras y se presentan como canales activos constitutivamente abiertos; lo cual se traduce en una incapacidad para regular su homeostasis interna (9,10). En condiciones hipo-osmóticas *S. cerevisiae* presenta varios mecanismos que permiten la adaptación de las células al medio en el que se encuentran (11). La entrada de agua hacia el medio intracelular activa el mecanismo de osmorregulación; uno de los primeros eventos es la apertura de Fps1, lo cual permite la liberación de glicerol hacia el medio extracelular para compensar de esta manera la osmolaridad y, por tanto, mantener el tamaño y forma celular (11). La cepa que no posee su acuagliceroporina (mutante Δ Fps1), muestra una respuesta disminuida ante un choque hipo-osmótico. La evidencia experimental obtenida en este estudio corrobora tal afirmación. Por otra parte, la presencia de la TcAQP2 en esta cepa permite la recuperación parcial del volumen celular, lo cual se evidenció por una menor disminución de la densidad óptica respecto a la cepa mutante Δ Fps1, aproximándose más al comportamiento de la cepa silvestre. En conjunto estos resultados demuestran la colaboración de TcAQP2 en los eventos de osmorregulación, mediante su participación en el paso de glicerol y/o agua a través de la membrana de la levadura. Para complementar este estudio, se requiere caracterizar la permeabilidad de la proteína a dichas sustancias a través de la cuantificación directa del transporte de estos solutos.

Las acuagliceroporinas son proteínas que intervienen en el transporte de drogas al interior celular. LmAQP1 representa la vía de acceso a SbIII, el compuesto activo de la droga glucantime, una de las principales líneas quimioterapéuticas en contra de la leishmaniasis (4), a su vez se ha demostrado que la regulación de la expresión de este canal en cepas silvestres implica la aparición de resistencia en estos parásitos (6). Asimismo se ha demostrado que las acuagliceroporinas de *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium* son posibles blancos de drogas, ya que representan vías de acceso a sustancias tóxicas para estos parásitos (10,15).

Para evidenciar la capacidad de transporte de compuestos tóxicos por parte de TcAQP2 se realizaron estudios de

citotoxicidad de AsIII y metilglioxal en levaduras expresando TcAQP2, con ello se intenta aportar más evidencias de que esta proteína es una acuagliceroporina, y a su vez mostrar la importancia de la misma como vía de ingreso a drogas. Estos compuestos son transportados por algunas acuaporinas de protozoarios; la LmAQP1 tiene una alta permeabilidad al AsIII y metilglioxal, hecho que explica la sensibilidad de *L. major* a estos compuestos (6). Igualmente la acuaporina de *P. falciparum* (PfAQP) es capaz de transportar metilglioxal al interior de la célula, lo que afecta la proliferación del parásito en el glóbulo rojo (15). Las acuaporinas involucradas en el transporte de estos solutos son acuagliceroporinas; la similitud de la estructura espacial de AsIII y metilglioxal con el glicerol, favorecen su paso al interior de la célula. El fenotipo de citotoxicidad obtenido para la TcAQP2, aunque tenue, sugiere que estos compuestos se transportan a través de este canal, ya que se observan diferencias en el crecimiento de las células que expresan TcAQP2 comparadas con las células control, cuando son expuestas a estas sustancias tóxicas. Sin embargo, se requieren estudios de permeabilidad para confirmar el transporte de AsIII y metilglioxal. Los fenotipos tanto de osmoregulación como de transporte de sustancias tóxicas, aunque evidentes, resultaron ser débiles, es posible que esta proteína, como ya fue reportado para TcAQP1 (8) sea un canal de baja permeabilidad a sus sustratos, sin embargo, no por ello menos importante para la fisiología del parásito (5). No se puede descartar que la proteína de *T. cruzi* expresada en este sistema heterólogo pudiera modificar su actividad como canal. En la actualidad se están desarrollando experimentos con otros sistemas de expresión heteróloga y homóloga para definir con precisión la conductancia de estos canales para sus distintos sustratos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto de grupo PG 09.00.7059.2007 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) y el presupuesto ordinario de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) (POA-2008).

Referencias

1. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler R, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118:1301-1310.
2. Pinto J. The Treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis) *Annals of Internal Medicine*. 2006;144:10.
3. Beitz E: Aquaporin Water and Solute Channels from Malaria Parasites and Other Pathogenic Protozoa. *Medicinal Chemistry Journal*. 20
4. Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S,

- Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279: 3010-3017.
5. Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279: 52270–52281.
6. Figarella K, Uzcátegui N, Yao Z, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, Mukhopadhyay R. Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Molecular Microbiology*. 2007; 65: 1006-1017.
7. Ausbel F, Brent R, Kinston R, Moore D, Seidman J, Struhl K. *Saccharomyces cerevisiae*. Current Protocols in Molecular Biology 2000. Jhon Wiley and Sons, Inc.
8. Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A Functional Aquaporin Co-Localizes with the Vacuolar Proton Pyrophosphatase to Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279:38673–38682.
9. Pettersson N, Hagstrom J, Bill R, Hohmann S. Expression of heterologous aquaporins for functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*.2006; 50:247-255.
10. Uzcátegui N, Szallies A, Pavlovic-Djuranovic S, Palmada M, Figarella K, Boehmer C, Lang F, Beitz E, Duszenko M. Cloning, Heterologous Expression and Characterization of three Aquaglycerolporins from *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological chemistry*. 2004; 279:42669-42676.
11. Hohmann S. Osmotic stress signaling and Osmoadaptation in yeasts. *Microbiology Molecular Biology*. 2002; 66: 300-372.
12. Yuan G, Hsien-yu W. Casein Kinase 2 Is Activated and Essential for Wnt/â-Catenin Signaling. *The Journal of Biological chemistry*, 2006; 281: 18394-18400.
13. Mellor H, Parker P. The extended protein kinase C superfamily. *The Journal of Biological chemistry*. 1998; 332: 281-292.
14. Papadopoulos M, Saadoun S, Verkman . Aquaporins and cell migration. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2007; 456:693-700
15. Pavlovic-Djuranovic S, Kun J, Schultz J, Beitz E. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the Plasmodium aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1758: 1012-1017.



La dimetilarginina asimétrica, estructura e implicaciones patológicas

Julio César González Martínez ^{1,2,*}, Dora Cristina González Rodríguez ², Leticia María Figueira De Freitas ³

Recibido: 27 Julio 2009; Aceptado: 26 Noviembre 2009; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

La aterosclerosis, es una enfermedad crónica, sistémica, inmuno- inflamatoria que afecta a la íntima arterial. La disfunción endotelial es la primera fase en la aterosclerosis. La disfunción endotelial está caracterizada por un daño y pérdida de la monocapa celular que cubre el interior de los vasos sanguíneos, denominada endotelio. Uno de los principales mediadores para el mantenimiento de la integridad del endotelio, es el óxido nítrico (ON). La Dimetilarginina asimétrica (DMAA), es un inhibidor endógeno de la enzima sintasa del Óxido Nítrico (SON); se ha sugerido que la DMAA sirve como un marcador de disfunción endotelial en enfermedades cardiovasculares. Asimismo, la DMAA representa un factor de riesgo para mortalidad cardiovascular, progresión de enfermedad crónica renal. Se ha encontrado valores elevados de DMAA en diferentes condiciones como hipercolesterolemia, aterosclerosis, hipertensión, insuficiencia renal crónica, insuficiencia crónica del corazón, diabetes y disfunción eréctil.

Palabras claves: DMAA, ON, SON, enfermedades cardiovasculares.

Asymmetric dimethylarginine, structure and pathological implications

SUMMARY

Atherosclerosis is an immune inflammatory systemic, arterial disease. Endothelial dysfunction is the first stage in atherosclerosis. Atherosclerosis develops because of reactions occurring in vessel wall beginning with response to endothelial injury. Endothelial dysfunction is characterized with impairment and loss of monolayer cells covering the inside of the vessels, which is endothelium. One of the main mediators for the maintenance of the integrity of endothelium is Nitric Oxide (NO). The asymmetric Dimethylarginine (ADMA), is an endogenous inhibitor of the enzyme Nitric Oxide Synthase (NOS). ADMA has been suggested to serve as a biomarker of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. ADMA is a risk factor for endothelial dysfunction, cardiovascular mortality, and progression of chronic kidney disease. Elevated values of ADMA have been found in hypercholesterolemia, atherosclerosis, hypertension, chronic renal insufficiency, heart chronic failure, diabetes and erectile dysfunction.

Key words: ADMA, NO, NOS, cardiovascular diseases.

* Solicitar copia a: jcgonzal@ucv.edu.ve.

1. Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

2. Laboratorio de Investigaciones del Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia – Venezuela.

3. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, sistémica e inflamatoria caracterizada por un engrosamiento de la íntima de arterial, que afecta a millones de personas en el mundo occidental, y puede ocasionar diversos eventos cardiovasculares como infarto, accidentes cerebro-vasculares, entre otros. Está caracterizada por la acumulación progresiva de lípidos, células (linfocitos T, macrófagos y células musculares lisas) y elementos fibróticos en la íntima de las arterias grandes y medias. En la actualidad, los sistemas de salud de los países del mundo occidental gastan cuantiosas sumas en la prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades (1). En las últimas décadas, numerosas investigaciones en este campo han permitido grandes avances en el conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades, y han ayudado a incrementar la vida de los pacientes que padecen de las mismas.

La fisiopatología de la aterosclerosis depende de múltiples factores, tanto genéticos como adquiridos; se cree que los mismos van a contribuir en el proceso patológico, que conlleva transformaciones en una arteria normal, para desarrollar disfunción endotelial progresiva. La disfunción endotelial está caracterizada por un daño y pérdida de la monocapa celular que cubre el interior de los vasos sanguíneos, denominada endotelio. Existe la hipótesis, donde la pérdida de la función endotelial normal, es el paso fundamental del inicio del proceso aterosclerótico. En este modelo conceptual la exposición constante del endotelio a factores de riesgo, conduce secuencialmente a la disfunción endotelial, seguido del aumento del espesor de la capa íntima y media, estenosis arterial y ruptura de la placa, produciendo trombosis vascular.

El endotelio tiene una importancia fundamental en el mantenimiento de la integridad vascular; ya que el mismo sintetiza diversos factores paracrinos, que producen vasodilatación y vasoconstricción; así como otros factores que median la vía hemostática. Uno de los productos sintetizados por el endotelio es el óxido nítrico (ON), el cual es un compuesto que causa vasodilatación. Diversos estudios realizados en modelos animales, sujetos normales así como en pacientes, han demostrado la importancia de este compuesto sobre la función endotelial (2); ya que, el ON no sólo influye en el tono vascular, sino que además inhibe la proliferación de las células musculares lisas, la agregación plaquetaria, y la adherencia y migración de células inflamatorias del espacio vascular al interior de la pared arterial. Asimismo es conocido que la producción deficiente de ON, constituye un factor de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares (3,4).

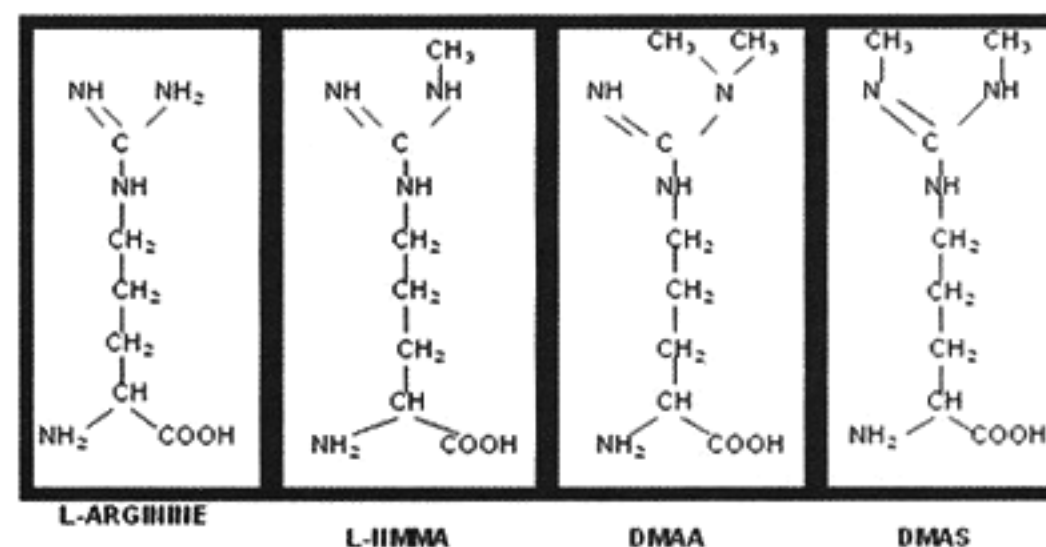
También se han descrito otros factores que contribuyen a la regulación normal del endotelio vascular, uno de ellos es la sintasa del ON (SON) cuyos niveles son regulados por

inhibidores endógenos conocido como la dimetilarginina asimétrica (DMAA) y la N- monometil-L-arginina (L-NMMA) (5). Los niveles plasmáticos de la DMAA son diez veces mayores que la NMMA (6-8).

DMAA

La DMAA, es un aminoácido producido naturalmente, que se encuentra en varios tejidos, y que circula en el plasma y se excreta por la orina (9,10). La DMAA se sintetiza a partir de la metilación de residuos de arginina de proteínas, por la acción de la enzima arginina metiltransferasa (MTsAP). Se han encontrados 2 tipos de estas enzimas, la tipo 1 cataliza la formación de DMAA, mientras que la tipo 2 cataliza la formación de DMAA y la formación de una molécula simétrica de dimetil arginina (DMAS). Los dos tipos de MTsAP también pueden monometilar, produciendo la formación de NMMA (11-13). En la Figura 1, se muestran las estructuras de la L-Arginina, L-NMMA, DMAA, DMAS.

Figura 1. Estructura de la Arginina, L-NMMA, DMAA y DMAS.



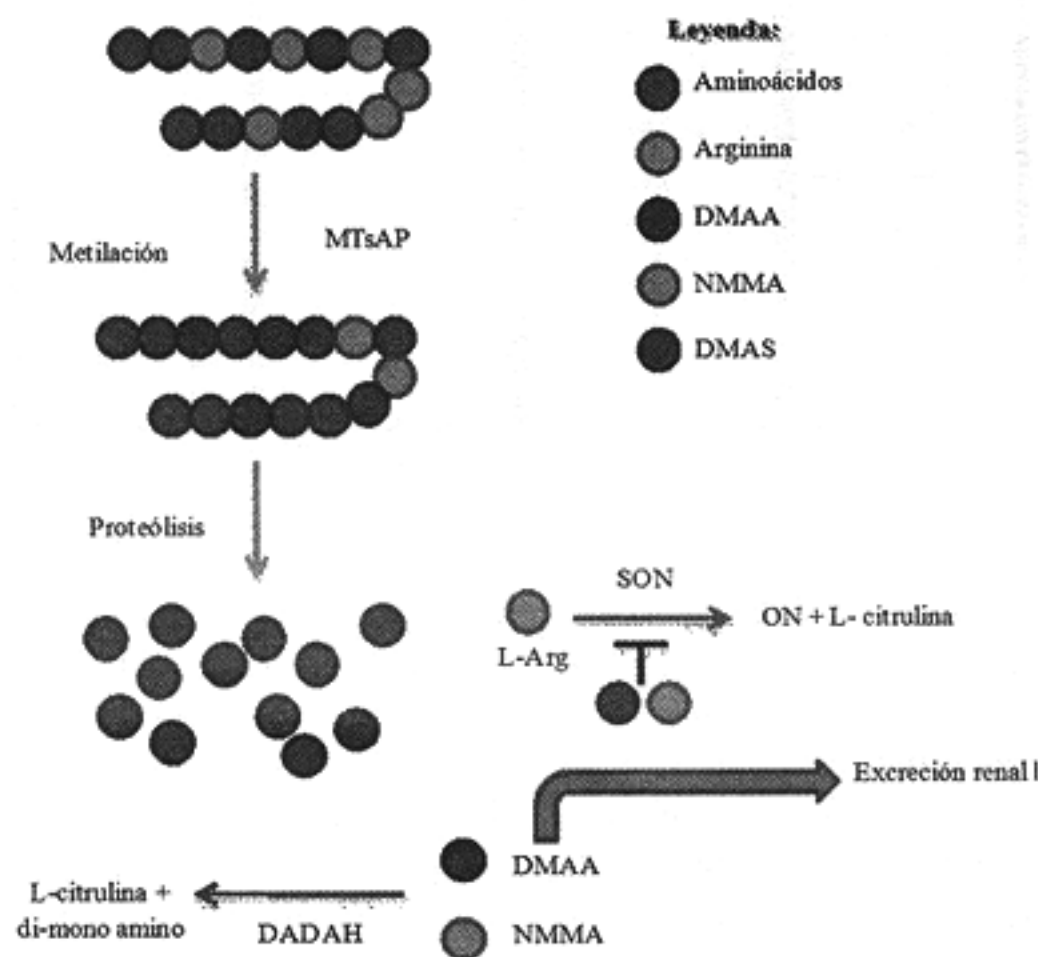
La DMAA, inhibe las 3 isoformas de la SON y tiene la misma fuerza de inhibición que el L-NMMA; por su parte, el DMSA no la inhibe. La inhibición de la SON *in Vitro* se produce en un amplio rango de concentraciones de DMAA; asimismo, dicha inhibición también ha sido reportada *in Vivo* (14,15). También se han medido los niveles plasmáticos de DMAA *in Vivo* en pacientes con enfermedades cardiovasculares o enfermedades metabólicas, encontrando niveles elevados de DMAA y disminución de ON (16-19).

Las concentraciones plasmáticas de DMAA en sujetos normales, por diferentes técnicas analíticas caen en un rango pequeño de 0,4 a 0,7 $\mu\text{mol/L}$; en cambio las concentraciones de L-arginina en plasma de sujetos normales se encuentran en un rango elevado, que se encuentran entre 60-140 $\mu\text{mol/L}$. Actualmente, existen pocas evidencias que demuestran que los niveles elevados de DMAA, son debido al aumento de la metilación de residuos de arginina. La metilación de arginina

en proteínas es un proceso altamente regulado, y las proteínas metiladas tienen un amplio rango de funciones.

La DMAA, se elimina a una tasa de 60 mg/24 horas (300 μ mol/24 horas) (20); de esta cantidad, aproximadamente 50 μ mol/24 horas es excretado por la orina (21), por lo tanto la DMAA se acumula en pacientes con insuficiencia renal. La degradación de DMAA se realiza por medio de la enzima dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DADAH) (22,23); de esta enzima, se han descrito 2 isoformas, la DADAH I predomina en tejidos neuronales, mientras que la DADAH II, predomina en tejidos endoteliales y tejido hepático (24). Asimismo, se ha propuesto que la elevación de DMAA plasmática en enfermedades vasculares se debe a la actividad disminuida de DADAH. En la Figura 2, se muestran las vías de eliminación y de degradación del DMAA y NMMA.

Figura 2. Síntesis, función y excreción de la DMAA. La DMAA es formada por metilación de los residuos de Arg mediante la enzima MTsAP. Tanto la DMAA como la NMMA son inhibidores de la SON. La DMAA es excretada por vía renal.



Efecto de la DMAA

En condiciones experimentales, con concentraciones sub óptimas de L-arginina, o deficiencias de cofactores esenciales para la SON, la actividad enzimática se desacopla; esto significa que la oxidación de L-arginina hasta ON no se completa (25,26).

Molecularmente en condiciones óptimas, lo que sucede en la enzima SON, es que cinco electrones son transferidos del O₂ a

L-arginina en 2 pasos de una reacción acoplada de oxidación-reducción en los dos dominios de la enzima SON produciendo L-citrulina y ON.

En condiciones sub óptimas, el flujo de electrones dentro de los 2 dominios de SON se interrumpe y el O₂ actúa como un aceptor de electrones. Esto permite que la enzima SON sea una enzima productora de radicales superóxido (O₂⁻).

En cultivos de células endoteliales humanas, se produce O₂⁻ en la presencia de DMAA, conduciendo a la hipótesis de que DMAA puede interrumpir la producción de ON, por la enzima SON y desacoplar así la enzima, resultando en una disminución de la formación de ON a partir de O₂. Esto a su vez conduce a la activación de factores de transcripción, que sobre regulan la expresión de moléculas de adhesión endotelial, y de allí incrementan la adhesividad de monocitos al revestimiento vascular (27).

Por lo tanto, en cultivo de células endoteliales humanas, en presencia de elevadas concentraciones de DMAA, se ha evidenciado incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, y un aumento de la adhesión de leucocitos a las células endoteliales. Igualmente, cuando los monocitos aislados de sangre periférica de pacientes con factores de riesgo cardiovascular, son incubados en cultivo de células endoteliales humanas, se observa que los monocitos provenientes de pacientes hipercolesterolémicos se adhieren más fuertemente al endotelio, que los monocitos provenientes de controles normo colesterolémicos; esta hiper adhesividad se normaliza al agregar L-arginina (28); lo cual indica que hay un desplazamiento competitivo de la L-arginina endógena por el DMAA, que causa los cambios en la adhesividad de los monocitos.

Sin embargo, algunos estudios experimentales en animales expuestos a dieta hiper colesterolémica, revelan que los niveles de DMAA se elevan rápidamente, sin observarse cambios apreciables en la integridad del endotelio arterial (29).

Métodos para medir los niveles de DMAA

El primer método utilizado para evaluar las concentraciones sanguíneas (plasma) de DMAA, fue la cromatografía de alta presión (HPLC); por medio de este método se puede separar el DMAA y su NMMA (30,31). También se han desarrollado métodos basados en la espectrometría de masa, y recientemente se ha desarrollado y validado un método cromatográfico, con interacción hidrofílica acoplado a un espectrómetro de masa, para la separación y cuantificación (5 minutos de duración) simultánea de L-arginina, DMAA y DMAS (32); sin embargo aunque son métodos muy buenos, son muy costosos, debido a su tecnología compleja; motivo por el cual se dificulta su implementación en laboratorios clínicos de manera rutinaria. Sin embargo, también se han desarrollado

inmunoensayos (ELISA) que han sido validados con el HPLC, demostrando buenos resultados de exactitud, precisión y especificidad; contando adicionalmente con la ventaja de que son métodos relativamente económicos, y que pueden ser utilizados con mínimos recursos, pudiendo por lo tanto, ser fácilmente implementados en laboratorios clínicos.

DMAA en enfermedades

Se han encontrado niveles elevados de DMAA en enfermedades metabólicas y cardiovasculares, en estas enfermedades los niveles de DMAA están asociados a disfunción endotelial de allí la importancia para el pronóstico de eventos cardiovasculares.

Enfermedad arterio coronaria

Diferentes estudios han evaluado la DMAA en diversos tipos de patologías cardiovasculares, y su relación con un evento cardiovascular futuro. De hecho, en pacientes a quienes les evaluaron los niveles de DMAA, seis semanas después de sufrir un ataque agudo coronario, y a quienes los valores de DMAA se encontraban todavía elevados, tuvieron un riesgo mayor de sufrir otro ataque a *posteri* (33-36). Por su parte, los pacientes que tienen un 95 % de obstrucción o más en una arteria epicárdica coronaria, tienen niveles elevados de DMAA, asociado a un deficiente desarrollo coronario colateral; en este sentido han especulado que la DMAA puede ser responsable, por la diferencia observada en el desarrollo de los vasos colaterales entre diferentes pacientes con enfermedad arterio coronaria; por lo que parece ser necesaria la concentración óptima de ON para el funcionamiento de la célula endotelial, y así el desarrollo de vasos colaterales en esta enfermedad (36).

En pacientes con el síndrome cardíaco X también se ha encontrado niveles elevados de DMAA y un aumento en el grosor de la capa íntima-media, reflejando la presencia de aterosclerosis subclínica. Estos hallazgos indican que además de la angina microvascular; la disfunción endotelial y la presencia de aterosclerosis, también contribuyen a la etiopatogenia del fenómeno síndrome cardíaco X (37).

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que, la DMAA es un marcador de riesgo para la enfermedad arterio coronaria, y puede proveer información adicional, a la suministrada por los indicadores de riesgos cardíacos tradicionales.

Enfermedad oclusiva de arterias periféricas

Pacientes con enfermedad oclusiva de arterias periféricas (EOAP), tienen niveles elevados de DMAA (dependiendo del estado clínico de los mismos), con respecto a sujetos aparentemente sanos de la misma edad, con función vascular normal (38). Asimismo, la excreción urinaria de los metabolitos de ON, se ve disminuida, dependiendo del grado de la enferme-

dad. Esta condición puede ser revertida por medio de la administración de L-arginina (39).

Insuficiencia crónica del corazón

Algunos estudios, han reportado elevaciones de DMAA en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (40). En insuficiencia sistólica crónica del corazón, la acumulación de metabolitos metilados de arginina está asociado a la presencia de disfunción diastólica del corazón (40).

Hipertensión

En pacientes con hipertensión arterial, también se han encontrado valores elevados de DMAA, y al mismo tiempo la excreción urinaria de metabolitos del ON está disminuida (41). El tratamiento con Nebivolol, un β bloqueante cardio selectivo, ha demostrado disminuir los niveles séricos de DMAA, y mejorar la disfunción endotelial en pacientes con hipertensión arterial (42).

Algunos estudios en animales, sugieren el papel fisiopatológico de DMAA en la regulación normal de la presión sanguínea. Otro estudio en humanos (43), ha encontrado asociación entre los niveles de DMAA y la hipertrofia del ventrículo izquierdo.

Anormalidades del metabolismo lipídico

En pacientes hipercolesterolémicos, se ha observado elevación de la concentración de DMAA, con respecto a la encontrada en pacientes normocolesterolémicos, a pesar de que estos pacientes no presentaban enfermedades cardiovasculares; estos resultados pueden sugerir que, el aumento de los niveles de DMAA, se presenta en las etapas tempranas de la aterosclerosis, contribuyendo posiblemente, en su progresión y ulterior establecimiento. Estos resultados están soportados por estudios donde la disfunción endotelial en pacientes hipercolesterolémicos puede ser revertida por medio de la suplementación de L-arginina en la dieta. Igualmente la hipertrigliceridemia, puede conducir a la elevación de DMAA produciendo disfunción endotelial (44).

Diabetes

En pacientes diabéticos tipo II, se ha encontrado niveles elevados de DMAA (45-48), los investigadores proponen la hipótesis de que, el mecanismo molecular de elevación del DMAA, puede ser el estrés oxidativo inducido por la desregulación de la enzima DDAH (49), o por el mecanismo dependiente de la angiotensina II (50,51).

Pre-eclampsia

La pre-eclampsia tiene tres síntomas clínicos principales, como lo son la hipertensión, el edema y la proteinuria, trayendo como consecuencia el riesgo de retardo de crecimiento intrauterino y aborto, el cual se cree es el resultado de la deficiencia en la

perfusión placentaria. En varios estudios (52,53), se han encontrado valores elevados de DMAA, en mujeres propensas a sufrir pre-eclampsia, de tal manera que puede ser considerado como un marcador para esta patología; asimismo es necesario recordar, que en la mujer embarazada existe una función endotelial normal, en cambio en la pre-eclampsia existe disfunción endotelial uterina.

Disfunción eréctil

En algunos pacientes con disfunción eréctil, la vía L-arginina \Rightarrow ON \Rightarrow GMPc, se encuentra alterada (54); este defecto bioquímico a menudo es causado por algunos factores de riesgos subyacentes en enfermedades cardiovasculares.

Algunos estudios (55,56), han mostrado que la disfunción eréctil en algunos pacientes con niveles bajos de excreción de metabolitos de ON, puede restablecerse con la suplementación de L-arginina; indicando que estos pacientes tienen un defecto en la vía de producción ON debido al aumento de niveles de DMAA.

Estudios clínicos recientes muestran que, los pacientes con disfunción eréctil enfermos, con diabetes o alguna enfermedad arterio coronaria, además de concentraciones elevadas de DMAA, tienen niveles disminuidos de L-arginina. De allí que sea importante determinar los niveles de DMAA en pacientes con esta patología, para discriminar su origen y enfocar su correcta terapia (57).

Insuficiencia renal crónica

Numerosos estudios (58), han confirmado la elevación de DMAA en la insuficiencia renal crónica; y en el estado final de esta enfermedad, se ha confirmado que el aumento del DMAA, es causado parcialmente por la deficiente eliminación de DMAA durante la hemodiálisis (59). Elevadas concentraciones de DMAA contribuyen a disfunción endotelial, que pueden en parte ser responsables, de la alta morbilidad cardiovascular en estas enfermedades (60,61).

La determinación de DMAA, permite conocer el pronóstico y progreso de la enfermedad crónica renal (62). Y tomando en cuenta que, la sangre es capaz de liberar cantidades fisiológicas significantes de DMAA por vía proteolítica; la liberación de DMAA no regulada de reservorios sanguíneos, puede contribuir a la característica elevación de DMAA en enfermedades renales crónicas (63).

Rechazo de trasplante renal

Los niveles elevados de DMAA sugieren un papel para la disfunción endotelial en el desarrollo de episodios de rechazo agudo (64,65).

Tratamiento de la elevación de DMAA

El tratamiento en patología cardiovascular debe dirigirse a revertir los efectos de la elevación de DMAA. Uno de esos tratamientos es reducir los niveles de DMAA y se puede lograr por medio de la L-arginina, la cual desplaza la DMAA y activa la SON. La farmacoterapia disponible actualmente puede reducir los niveles de DMAA, como se ha observado en diabéticos medicados con Metformina (66), Rosiglitazona en pacientes con resistencia a la insulina (67), Captopril y Enalapril (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina) y Losartán y Valsartán (antagonista de los receptores de angiotensina II) en pacientes hipertensos (68). Los estrógenos solos o con progestágenos, aumentan la expresión de la DDAH (69), las Estatinas, sobre regulan la expresión del gen de la SON endotelial; de hecho, en pacientes con valores de DMAA elevados, la SON no ejerce su función esperada, ya que su actividad está bloqueada (70,71); por lo que las Estatinas sólo mejoran la vasodilatación dependiente del endotelio, cuando se las administra asociada a L-arginina en la dieta (72).

En pacientes con deficiencia de la hormona de crecimiento (HG), el remplazo de HG contribuye a disminuir, en algún grado el riesgo cardiovascular, los niveles de DMAA y mejorar el cociente Arginina/DMAA y la disfunción endotelial (73). Recientemente se ha encontrado que el fármaco Telmisartán utilizado en hipertensión, disminuye los niveles de DMAA presumiblemente vía la activación (por receptor gamma) de un activador proliferador de peroxisomas sugiriendo que este agente mejora la función vascular vía su efecto pleiotrópico, un mecanismo que es diferente de su efecto hipotensivo (74).

Conclusiones

La DMAA juega un importante papel en la regulación del tono vascular, al actuar como inhibidor de la síntesis del ON, y así aumentar la resistencia vascular, disminuyendo el flujo sanguíneo. Por otra parte, el DMAA es promotor de la aterogénesis, al inhibir la producción de ON que es un vasoprotector. De este modo, la elevación de DMAA incrementa la progresión de aterosclerosis y aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El DMAA se ha convertido en marcador de riesgo cardiovascular.

Referencias

1. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics—2004 Update. Dallas, Tex: American Heart Association; 2003.
2. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med.* 1997. 48:489–509.
3. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000. 101:1899–1906.



4. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000. 101: 948-954.
5. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003. 41:1769-1775.
6. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992. 339:572-575.
7. Altan S. Asymmetric dimethylarginine, NO and collateral growth. *Ana do lu Kar di yol Derg* 2009; 9: 417-420.
8. Böger RH. The Pharmacodynamics of L-Arginine. *J. Nutr*. 2007; 137: 1650S-1655S.
9. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997. 48:489-50.
10. Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: *in vivo* transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92:1137-1141.
11. Oblanyo O, Osborne TC, Thompson PR. Kinetic Mechanism of protein Arginine Methyltransferase 1. *Biochemistry*. 2008. 5:700-710.
12. McBride AE, Silver PA. State of the Arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. 2001. 106:5-8.
13. Zakrzewicz D, Eickelberg O. From arginine methylation to ADMA: A novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulmonary Medicine* 2009, 9:1-7.
14. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1997. 95:2068-2074.
15. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998. 98:1842-1847.
16. Galán A, Hormiguera X, Rey-Joly C. Asymmetric dimethylarginine as cardiovascular risk factor. *Med Clin (Barc)*. 2008. 131 (7):271-275.
17. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am. J. Physiol*. 1995. 268:H2224-H2231.
18. Tsikas D, Sandmann J, Böger RH, Gutzki FM, Mayer B, Frölich JC. Assessment of nitric oxide synthase activity by gas chromatography-mass-spectrometry. *J Chromatogr. B* 2000. 742:143-153.
19. Szuba A, Podgórski M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) a novel cardiovascular risk factor – evidence from epidemiological and prospective clinical trials. *Pharmacological Report* 2006; 58: 16 – 20.
20. Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23:1455-1459.
21. Vallance P, Leone A, Calver A, et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992. 339:572-575.
22. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, et al. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol*. 2001. 8:679-686.
23. Palm F, Onozato M, Luo Z, Wilcox C. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3227-H3245.
24. Richir MC, Bouwman RH, Teerlink T, et al. The Prominent Role of the Liver in the Elimination of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and the Consequences of Impaired Hepatic Function. *J Parenter Enteral Nutr* 2008. 32(6):613-621.
25. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95:9220-9225.
26. Druhan L, Forbes S, Pope A, Chen Ch, Zweler JL, Cardounel AJ. Regulation of eNos-Derived Superoxide by Endogenous Methylarginines. *Biochemistry*, 2008. 47(27):7256-7263.
27. Boger RH, Bode-Boger SM, Tsao PS, et al. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2000. 36:2287-2295.
28. Chan J, Böger R, Bode-Böger S, et al. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1040-1050.
29. Böger RH, Bode-Böger SM., Mügge A, et al. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis*. 1995. 117:273-284.
30. Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar DK. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. *Clin Chim Acta*. 2008:397:53-56.
31. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007.851(1-2):21-29.
32. D'Apolito O, Paglia G, Tricarico F, Garofalo D, Pilotti A, Lamacchia O, Cignarelli M, Corso G. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2008. 41(16-17):1391-1395.
33. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2003. 24:1912-1919.
34. Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Münzel T. Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients With Coronary Artery Disease: Results from the AtheroGene Study. *Circ. Res*. 2005. 97:e53-e59.
35. Krempf TK, Maas R, Sydow L, Meinertz T, Böger RH, Kähler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J*. 2005. 26:1846-1851.

36. Kocaman SA, Sahinarslan A, Biberoglu G, Hasanoglu A, Akyel A, Timurkaynak T, Cengel A. Asymmetric dimethylarginine and coronary collateral vessel development. *Coron Artery Dis.* 2008. 19:469-474.
37. Sen N, Poyraz F, Tavil Y, Yazici HU, Turfan M, Hýzal F, Topal S, Erdamar H, Cakir E, Yalçýn R, Cengel A. Carotid intima-media thickness in patients with cardiac syndrome X and its association with high circulating levels of asymmetric dimethylarginine. *Atherosclerosis* 2008. 201:220-225.
38. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1997. 95:2068-2074.
39. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frolich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998. 32:1336-1344.
40. Wilson Tang WH, Tong W, Shrestha K, Wang Z, Levison BS, Delfraio B, Hu B, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL. Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure. *Eur Heart J.* 2008. 29:2506 - 2513.
41. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999. 33:652-658.
42. Pasini AF, Garbin U, Stranieri C, et al. Nebivolol Treatment Reduces Serum Levels of Asymmetric Dimethylarginine and Improves Endothelial Dysfunction in Essential Hypertensive Patients. *Am J Hypertens.* 2008. 21:1251-1257.
43. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodelling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002. 62:339-345.
44. Lundman P, Eriksson MJ, Stuhlinger M, et al. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol.* 2001. 38:111-116.
45. Fard A, Tuck CH, Donis JA, et al. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:2039-2044.
46. Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2001; 88:1201-1203.
47. Yamagishi S, Ueda S, Nakamura K, et al. Role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in diabetic vascular complications. *Curr Pharm Des.* 2008. 14(25):2613-2618.
48. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, et al. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2008. 41(18):1454-14.
49. Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylamino-hydrolase. *Circulation.* 2002;106: 987-992.
50. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A. Angiotensin-Converting Enzyme Activity is Involved in the Mechanism of Increased Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ J.* 2002. 66:811-815.
51. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Wolzt M, Schernthaner G. ADMA, cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008. 82: 150-160.
52. Savvidou M, Hingorani A, Tsikas D, Frolich J, Vallance P, Nicolaides K. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet.* 2003. 361:1511-1517.
53. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, Hagberg H. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe Preeclampsia. *Acta Obst Gynecol Scand.* 80: 602-608.
54. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, Böger RH. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med.* 2002. 7:213-225.
55. Wierzbicki AS, Solomon H, Lumb PJ, et al. Asymmetric dimethyl arginine levels correlate with cardiovascular risk factors in patients with erectile dysfunction. *Atherosclerosis* 2006. 185(2):421-425.
56. Maas R, Schwedhelm E, Albsmeier J, et al. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vasc Med.* 2002 ;7(3): 213-225.
57. Masuda H. Significance of nitric oxide and its modulation mechanisms by endogenous nitric oxide synthase inhibitors and arginase in the micturition disorders and erectile dysfunction. *Int J Urol.* 2008. 15(2):128-34.
58. Böger RH, Zocalli C. ADMA: A novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patient with end-stage renal disease. *Atherosclerosis Suppl.* 2003. 4:23-28.
59. Schnabel R, Blankenberg S, Lubus E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Munzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the atheroGene Study. *Circ Res.* 2005. 97:e53-59.
60. Kielstein JT, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a novel marker of risk and a potential target for therapy in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008. 17(6):609-615.
61. Mallamaci F, Zocali C. Clinical implications of elevated asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease and end-stage renal disease. *J Ren Nutr.*
62. Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Vollmer S, et al. L-Arginine, ADMA, SDMA, creatinine, MDRD formula: detour to renal function testing. *J Nephrol* 2008. 21(6): 959-961.
63. Billecke SS, D'Alecy LG, Platel R, et al. Blood content of asymmetric dimethylarginine: new insights into its dysregulation in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2008. 23.118-132.
64. Esposito C, Grosjean F, Torreggiani M, et al. Increased Asymmetric Dimethylarginine serum levels are associated with acute Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2009. 41(5):1570-1573.

65. Zhang W, Zhou C, Xie J, et al. Serum asymmetric dimethylarginine and endothelial function after renal transplantation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Xi Xue Ban*. 2009. 34(4):289-294.
66. Asagmi T, Abbasi F, Stuehlinger M, et al. Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2002; 51:843-846.
67. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 2002;287: 1420-1426.
68. Delles C, Schneider MP, John S, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2002. 15(1):590-593.
69. Holden DP, Cartwright JE, Nussey SS, et al. Estrogen stimulates dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and the metabolism of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003. 108:1575-1580.
70. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) modulates endothelial function therapeutic implications. *Vasc Med*. 2003. 8:149-151.
71. Janatuinen T, Laakso J, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Lehtimäki T, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine modifies the effect of pravastatin on myocardial blood flow in young adults. *Vasc Med*. 2003. 8:185-189.
72. Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf R, Kastner M, et al. Improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin is potentiated by combination with L-arginine sustained release in patients with elevated ADMA levels. *J Am Coll Cardiol*. 2004. 34:A525.
73. Setola E, Monti LD, Lanzi R, Lucotti P, Losa M, Gatti E, Galluccio E, Oldani M, Fermo I, Giovannelli M, Bosi E, Piatti P. Effects of growth hormone treatment on arginine to asymmetric dimethylarginine ratio and endothelial function in patients with growth hormone deficiency. *Metabolism*. 2008. 57(12):1685-1690.
74. Ono Y, Nataya Y, Bando S, Soeki T, et al. Telemisartan decreases plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine and improves lipid and glucose metabolism and vascular function. *Int Heart J*. 2009. 50(1):73-83.



Efecto de la vitamina C, sobre la actividad de glutathion peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica

Figueira Leticia¹, González Julio C. ^{1,2,*}

Recibido: 30 Octubre 2009; Aceptado: 12 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en la aterosclerosis; de hecho existe evidencias que indican que los antioxidantes son moléculas capaces de retardar y/o revertir el proceso aterosclerótico. El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de la Vitamina C (Vit C), sobre la actividad de la Glutathion peroxidasa (GPx) y la formación de ateromas en conejos. Se estudiaron 36 conejos divididos en 3 grupos: Grupo1 (Control): conejarina, Grupo2: huevo y conejarina, Grupo 3: huevo, conejarina y Vit C (100 mg/diarios). El período experimental duró 12 semanas. Se determinó perfil lipídico por métodos enzimáticos y la actividad de GPx por cinética en 0 y 12va semana. Los conejos fueron sacrificados y se les realizó estudio histológico de su aorta. Los resultados revelaron un incremento en la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 con respecto al control en la 12va semana de experimentación ($p < 0,05$). Hubo inhibición de lesiones ateroscleróticas en los conejos del grupo 3. En conclusión en condiciones de hiperlipidemia con o sin suplementación de Vit C, existe incremento en la actividad de GPx. Por otra parte, la Vit C disminuye y evita la progresión de ateromas.

Palabras claves: Estrés oxidativo, Vit C, GPx, aterosclerosis.

Effects vitamin C, on glutathione peroxidase activity and atheroma formation, in rabbits exposed to a hyperlipidaemic diet

SUMMARY

Oxidative stress plays an important role in atherosclerosis; so antioxidants are molecules have been used to slow down or inhibit atherosclerosis. The objective of the present study was to compare the effect of Vitamin C (Vit C), on serum Glutathione peroxidase activity (GPx) and on the formation of aortic lesions in rabbits. 36 rabbits were studied: Group1: "conejarina" (commercial rabbit food); Group2: egg and conejarina, Group3: egg, conejarina and Vit C (100mg/day). The experiment lasted 12 weeks. Lipid profile was done by enzymatic methods and GPx by kinetic method in weeks 0 and 12. Histological study of rabbit's aorta was done. GPx activity in groups 2 and 3, increased compared with controls, from week 12 of experimentation ($p < 0,05$). There was inhibition of aortic lesions in groups 3. In conclusion, under hyperlipidaemic conditions, with or without Vit C supplementation, activity of GPx there is increased. Vit C reduces and prevents the progression of atheromas

Key words: Oxidative stress, Vit C, GPx, atherosclerosis.

* Solicitar copia a: jgonzal@ucv.edu.ve.

1. Laboratorio de investigaciones del postgrado de la Escuela de Bioanálisis..

2. Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas (CIMBUC); Facultad de Ciencias de la Salud; Universidad de Carabobo, Valencia – Venezuela.

Introducción

Los radicales libres son especies químicas, altamente reactivas e inestables que tienen en su estructura atómica uno o más electrones no apareado en su última capa (1). Entre los radicales libres, se encuentran el radical hidroxilo, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, ácido hipocloroso, peroxinitrito, entre otros, los cuales pueden ser generados en el organismo como resultado del metabolismo aerobio (2). La incrementada generación de estas moléculas o iones puede causar daño oxidativo a diversas moléculas como lípidos, proteínas y ADN, lo cual puede llevar a enfermedades crónicas como la aterosclerosis (3-5).

La aterosclerosis es una enfermedad crónica inmuno inflamatoria, caracterizada por un endurecimiento y pérdida de elasticidad de la pared arterial; así como un estrechamiento del lumen arterial, que afecta principalmente a las arterias de mediano y gran calibre. Este proceso se inicia desde la infancia y la adolescencia (6-8). Es conocido que las consecuencias clínicas de esta enfermedad, son causa de elevada mortalidad en diferentes países, siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de muerte en nuestro país (9). Actualmente existe suficientes evidencias que indican que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el proceso aterosclerótico (10-13).

La susceptibilidad del endotelio vascular al daño oxidativo es una función que va a depender del balance entre el grado de estrés oxidativo y la capacidad de defensa de los antioxidantes (5,14,15); por lo tanto los antioxidantes son un sistema de defensa, al daño oxidativo producido por los radicales libres. Los antioxidantes son clasificados como exógenos (naturales o sintéticos) o endógenos, ambos son responsables de la remoción de los radicales libres. Los antioxidantes naturales son clasificados en dos grupos: enzimático y no enzimático. Los antioxidantes enzimáticos incluyen a la catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), entre otros. Entre los antioxidantes no enzimáticos, se encuentran el ácido ascórbico, polifenoles, entre otros (1,16-18).

La Vitamina C (Vit C) o ácido ascórbico es un antioxidante de naturaleza hidrosoluble, que actúa mediante la remoción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (19-21). Asimismo, la Vit C es capaz de regenerar otras moléculas antioxidantes como á-tocoferol, glutatión, urato, á-caroteno. Por otra parte, se ha evidenciado que el ascorbato es uno de los principales antioxidantes que neutraliza directamente a los radicales libres (22,23). Y en estudios *in vivo* se ha demostrado que es capaz de disminuir la progresión de la aterosclerosis (12).

Por su parte, la GPx es un término que describe a una familia de enzimas (EC 1. 11. 1. 9.), que tienen actividad peroxidasa.

Por lo que, la GPx es una proteína de naturaleza enzimática que contiene selenio, y que se encarga de reducir el peróxido de hidrógeno y una amplia gama de hidroperóxidos orgánicos en sus correspondientes alcoholes, requiriendo glutatión como cofactor, y de igual manera oxida el glutatión a glutatión disulfido (24-26). La actividad de esta enzima se está investigando como marcador biológico de patologías como la aterosclerosis (12,27). Asimismo, se han descrito disminución de la actividad de esta enzima en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo la enfermedad coronaria (28).

Por lo tanto, tomando en cuenta que el estrés oxidativo está involucrado en la fisiopatología de la aterosclerosis, y que los efectos deletéreos de los radicales libres pueden ser prevenidos por la acción de los antioxidantes. En el presente estudio se evaluó el efecto que tiene la Vit C, sobre la actividad de la GPx y sobre la formación de ateromas en conejos macho Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica.

Materiales y Métodos

Muestra y diseño experimental

Se utilizaron 36 conejos macho raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1,350 – 1,400 Kilogramos, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC, Caracas, Venezuela). Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (UC) (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos de 12 conejos. Cada conejo fue alimentado diariamente de la siguiente manera: Grupo 1 (control): 150 gramos de conejarina (Protinal®, Venezuela). Grupo 2: un huevo hervido y 150 gramos de conejarina. Grupo 3: un huevo hervido, 150 gramos de conejarina y 100 mg de Vit C (Merck). El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas.

Todos los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los procedimientos de cuidado de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (29). El experimento fue realizado rigurosamente según las normas éticas del Bioterio Central de la UC. Estos animales estuvieron bajo la vigilancia del personal del bioterio a lo largo del estudio.

Análisis químico de los alimentos

Conejarina G granulada marca Protinal®: Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B₂, B₁₂, C, D₃, E, ácido

pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

Huevo (30): Cada huevo contiene aproximadamente 300 mg de colesterol en su yema. El porcentaje de colesterol en cada ración de alimento para los grupos 2 y 3 fue de 0,12%.

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca bajo anestesia a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en la semanas 0 y 12va. Las muestras de suero fueron conservadas en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos colorimétrico directo (Wiener Lab, Argentina). El c-HDL, c-LDL se realizaron por extracción y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). La actividad de la GPx fue determinada por ensayo cinético (Cayman Chemical, EEUU).

Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas: Los conejos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina (31), para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association (32).

Análisis de los datos

Se calculó el promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se empleó la correlación de Pearson para relacionar el perfil lipídico con los niveles de la actividad de la GPx. Se utilizó el análisis de varianza para comparar los valores de las variables sujetas a estudio, empleando el análisis de Kruskal – Wallis para comparar grupos independientes y el análisis de Friedman para comparar grupos relacionados, y una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa Statistix versión 8.

Resultados

No se encontraron diferencias significativas en los pesos basales entre los grupos de conejos sujetos a estudio. En la 2da, 4ta, 6ta, 8va, 10ma y 12va semana de experimentación hubo un incremento significativo en el peso de los conejos de los grupos 2 y 3 con respecto al grupo 1, y con respecto a sus pesos basales ($p < 0,05$). Los conejos del grupo 1 aumentaron de peso a lo largo del estudio. Asimismo, no se encontraron

diferencias en los pesos de los conejos entre los grupos 2 y 3 a lo largo del experimento (Datos no mostrados).

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de CT, c-HDL, c-LDL y TG basales entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del experimento. Al final del estudio se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 2 y 3 con respecto al grupo 1. Asimismo, para los grupos 2 y 3 los valores de CT, c-HDL, c-LDL y TG variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar del perfil lipídico.

Variables (mg/dL)	Semana Cero		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Colesterol	88 ± 8 A	91 ± 11 A	87 ± 9 A
C-HDL	28 ± 4 A	28 ± 3 A	30 ± 2 A
C-LDL	52 ± 6 A	55 ± 4 A	57 ± 6 A
Triglicéridos	90 ± 12 A	88 ± 9 A	88 ± 10 A
Variables (mg/dL)	Semana Doce		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Colesterol	83 ± 9 A	1072 ± 167 B	1073 ± 130 B
C-HDL	28 ± 4 A	72 ± 10 B	71 ± 12 B
C-LDL	53 ± 4 A	996 ± 150 B	913 ± 147 B
Triglicéridos	88 ± 10 A	159 ± 16 B	155 ± 21 B
Variables (mg/dL)	Valores p		
Colesterol	0,2411	0,0025	0,0025
C-HDL	0,7671	0,0025	0,0025
C-LDL	0,3066	0,0025	0,0025
Triglicéridos	0,9687	0,0025	0,0025

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,05$

Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales. Análisis de Friedman. $p < 0,05$.

En cuanto a la GPx, no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre los grupos sujetos a estudio en el inicio del experimento. Asimismo, no se observó diferencias significativas en los niveles de GPx en el grupo 1 al inicio y final del estudio. Para la 12va semana, se observó que la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 difieren de los encontrados en el grupo 1. Asimismo para los grupos 2 y 3, los valores de la actividad de GPx variaron al final de la investigación con respecto a sus valores basales ($p < 0,05$). (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la actividad de la GPx.

Semana Cero			
Variabes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
GPx (nmol/min/mL)	70,33 \pm 3,80 A	71,33 \pm 13,37 A	74,50 \pm 11,78 A
Semana Doce			
Variabes	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
GPx (nmol/min/mL)	73,18 \pm 6,70 A	128,53 \pm 14,56 B	117,10 \pm 14,09 B
Valores p			
GPx	0,1078	0,0025	0,0025

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,05$.

Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales. Análisis de Friedman. $p < 0,05$.

No se observó asociación significativa entre las variables sujetas a estudio en los diferentes grupos de conejos al inicio y final del estudio.

En cuanto a los cortes histológicos en las aortas, se observó que ningún conejo del grupo 1 evidenció lesiones ateroscleróticas (Tabla 3). Todos los conejos del grupo 2 evidenciaron lesiones de tipo III y IV (Figura 1). Por su parte, algunos conejos del grupo 3 no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable (Figura 2).

Tabla 3. Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.

GRUPO	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Tipo VI
1	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0 (0%)	0 (0%)
3	4 (33,3%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Figura 1. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 2. Se observa en la íntima arterial abundantes cúmulos de lípidos intracelulares (flechas blancas) y extracelulares (flecha negra). Lesión Tipo IV. Tinción hematoxilina–eosina. 100X.

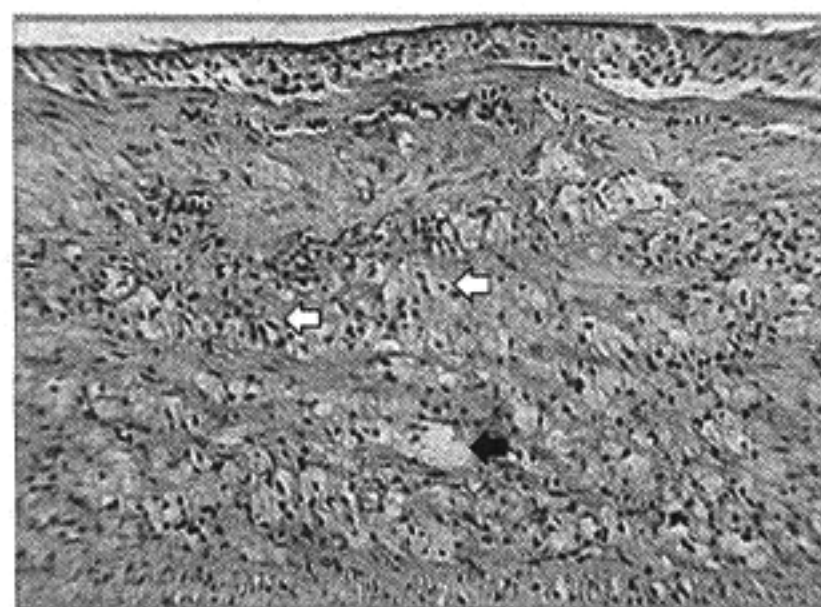
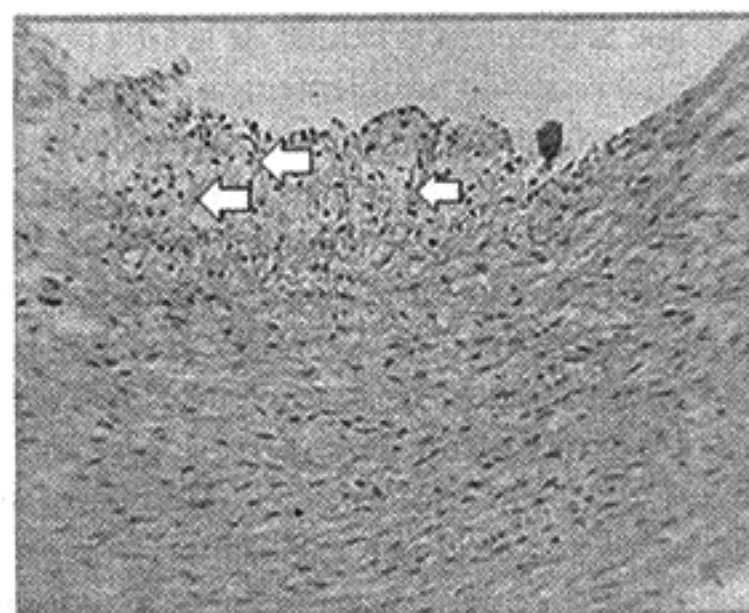


Figura 2. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 3. Se observa en la íntima arterial cúmulos de células espumosas con lípidos intracelulares (Flechas). Lesión Tipo II. Tinción hematoxilina–eosina. 50X.



Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la Vit C sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas en conejos; evidenciándose que al inicio del experimento todos los grupos de conejos fueron semejantes entre sí, pues no se observaron diferencias en las variables estudiadas.

En cuanto al peso de los conejos, se pudo apreciar que todos los conejos aumentaron de peso a lo largo del estudio, tal y como se ha reportado previamente (12,13,33); esto es debido a que los mismos son conejos jóvenes que estaban en período de crecimiento.

Asimismo se pudo observar que la dieta suministrada a los grupos 2 y 3 fue hiperlipidémica; ya que la concentración sérica de CT y TG en la 12va semana de estudio en estos grupos aumentó, tal y como lo hemos reportado en otros estudios (12,13,33); esto pudo ser debido a que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides (34,35), incrementándose de esta manera su perfil lipídico. Asimismo, es importante destacar que la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia no se evitó a pesar del consumo de antioxidantes (Vit C), lo cual ha sido previamente reportado (12,34).

La falta de suplementación de antioxidantes, así como la hipercolesterolemia, ha estado relacionada con un incremento en la oxidación de LDL (10,36). Para combatir el estado de estrés oxidativo, el organismo cuenta con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los mecanismos enzimáticos incluyen la GPx (27). Esta enzima representa la principal línea de defensa antioxidante en células de mamíferos (37).

En el presente estudio se pudo observar que la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 estuvo incrementada con respecto al grupo 1; esto pudo ser ocasionado por la dieta hiperlipidémica que consumieron los conejos pertenecientes a estos grupos, ya que la hiperlipidemia es capaz de ocasionar un estado de estrés oxidativo (38).

Se ha observado que la deficiencia celular de la GPx promueve disfunción endotelial asociado posiblemente a estrés oxidativo (39), por su parte la expresión y actividad de esta enzima se incrementan ante un ambiente pro oxidante (40,41); tal y como lo reportamos en nuestro estudio; este incremento en la actividad puede obedecer a una medida de respuesta por parte del organismo para combatir el estrés oxidativo; ya que la GPx tiene un papel muy importante en la prevención del mismo, puesto que la expresión reducida de la enzima, incrementa la oxidación de las LDL en ratones (42). Asimismo se ha propuesto que la GPx podría ser una importante enzima antiaterogénica, debido a que su actividad está disminuida o ausente en placas ateroscleróticas; por lo que la falla de su

actividad en la placa parece encontrarse asociada con el desarrollo de lesiones más severas en humanos (43,44). Por otra parte, otros investigadores han demostrado que en pacientes con enfermedad coronaria existe una baja actividad de GPx, la cual está relacionada con el riesgo incrementado de los pacientes a sufrir eventos cardiovasculares; por lo que la inducción en la actividad de esta enzima podría disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares en estos pacientes (45).

Es importante tener en cuenta que a pesar de la administración de antioxidantes (Vit C), la actividad de la GPx, no evidenció cambios con respecto al grupo 2, demostrando que bajo las condiciones de nuestro estudio no hubo diferencias en la inducción de la actividad de la enzima entre los grupos 2 y 3; sin embargo, la administración de antioxidantes disminuyó el grado y la presencia de lesiones ateroscleróticas con respecto al grupo de conejos que no fueron suplementado y que se les administró lípidos en su dieta (grupo 2); sugiriendo que a pesar de no existir diferencias en la actividad de la GPx (defensa antioxidante) entre estos grupos de conejos, posiblemente existe una menor concentración de marcadores de oxidación, como la LDLox, en los conejos suplementados con antioxidantes, como ya lo hemos reportado previamente (12,13).

El estrés oxidativo ha sido implicado como un importante factor etiológico en la aterosclerosis; de hecho los antioxidantes pueden disminuir la aterogénesis y mejorar la función vascular; ya que son capaces de disminuir la oxidación de las LDL, disminuyen la producción de radicales libres en la pared arterial, inhiben la activación endotelial (expresión de moléculas de adhesión celular, moléculas quimioatrayentes, entre otros) y mejoran la actividad biológica del óxido nítrico derivado del endotelio (1-8,10,11,18-23).

En cuanto a la formación de lesiones ateroscleróticas, se pudo apreciar que la dieta administrada a los conejos con lípidos, fue aterogénica, pues indujo lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado en los conejos que consumieron únicamente esta dieta; por su parte, como era de esperar los conejos del grupo 1, no evidenciaron lesiones, pues no consumieron una dieta rica en lípidos; estos resultados coinciden con los reportados previamente (12,13,33,35).

Por su parte, la administración de Vit C en la dieta de los conejos del grupo 3, logró disminuir la formación y el grado de las lesiones ateroscleróticas, ya que la mayor parte de estos conejos no evidenciaron lesiones, o tuvieron lesiones de grado leve o medio, demostrando que la Vit C es efectiva en disminuir la formación y progresión de lesiones en conejos sometidos a dieta hiperlipidémica bajo nuestras condiciones de estudio, tal y como ha sido reportado previamente (12).

La acción antiaterogénica de la Vit C observada en nuestro estudio, pudo ser debida a sus efectos antiinflamatorios, además de sus efectos antioxidantes; ya que la Vit C inhibe la disfunción celular, la liberación de IL-6 y moléculas de adhesión celular (19). Asimismo, la Vit C es uno de los antioxidantes más potentes, que en concentraciones fisiológicas es capaz de inhibir las modificaciones oxidativas de las LDL *in vivo* (46); así como de revertir la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad coronaria arterial (47). Es importante tener en cuenta que la Vit C es un antioxidante efectivo por varias razones, ya que tanto el ascorbato como el radical ascorbilo tienen bajos potenciales de reducción y pueden reaccionar con la mayoría de radicales y oxidantes relevantes biológicamente; por otra parte, el radical ascorbilo tiene baja reactividad, por lo que rápidamente puede ser convertido a ascorbato y ácido dehidroascórbico; adicionalmente el ascorbato puede ser regenerado desde el radical ascorbilo por mecanismos dependientes e independientes de enzimas (22). Por lo tanto, estas propiedades y acciones de la Vit C pueden sugerir una explicación al efecto beneficioso sobre la inhibición de la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas visto en nuestro estudio.

En conclusión se tiene que bajo condiciones de hiperlipidemia, en presencia o ausencia de antioxidantes, la actividad de la GPx se encuentra incrementada; sin embargo, la Vit C, fue efectiva en inhibir la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas bajo nuestras condiciones de estudio.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por el Laboratorio Clínico Julio González. Agradecemos a María De Freitas y Manuel Dinis por su valiosa colaboración y ayuda, en la toma de muestra de sangre y en la disección de los conejos. Al Bioterio Experimental de la UC por facilitarnos las instalaciones para llevar a cabo el experimento. Y al Bioterio Central por su asistencia técnica.

Referencias

- Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options- *Curr Neuropharmacol* 2009; 7: 65-74.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924): 721-724.
- Yun-Zhong, F, Sheng Y, Guoyao Wu. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872- 879.
- Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 2009; 73 (4): 595-601.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 2009; 73: 411 – 418.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets and Atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62 (10): 1161-1178.
- Holvoet P, De Keyzer D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol*. 2008; 3(6): 637-649.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci*. 2009; 5 (5): 474-488.
- Ewald M, Campos G, Rivero F, Álvarez L, Torres E, Arocha P, Ryder E, Arteaga M, Vizcaíno G, Fernández N. Factores hemostáticos de riesgo coronario en una población sana de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clín* 2003; 44: 21-30.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*. 2009; 50 (5): 402-409.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 29-38.
- Figueira L, González J. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, vitaminas C y E sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 2008; 10: 593-607.
- González J, Figueira L, González D, Álvarez A, Aguilera C, Reigosa A. Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y Proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 2007; 10 (2): 86-90. Publicado en el 2009.
- Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of Oxidative Stress and Redox Regulation in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16: 1-7.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001; 40: 959-975.
- Heistad D, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009;73 (2): 201-207.
- Brambilla D, Mancuso C, Scuderi M, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R. The roles of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile *Nutr J* 2008; 7: 29-38.
- Berk BC. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2007; 118: 209-214.
- Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *PSEBM* 1999; 222: 196-204.
- Kojo S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1041 – 1064.
- May J. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J* 1999; 13: 995-1006.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; 13: 1007 – 1024.
- Aguirre R, May JM. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther*. 2008; 119 (1): 96-103.
- Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2004; 109: 544 – 549.

25. Zhang Y, Handy D, Loscalzo J. Adenosine dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cell and protection against oxidative stress. *Cir Res* 2005; 96: 831 – 837.
26. Yegin A, Yegin H, Aliciguze Y, Deger N, Semiz E. Erythrocytes selenium glutathione peroxidase activity is coger in patients with coronary atherosclerosis. *Jpn Hert J* 1997; 38: 793 – 798.
27. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*. 2004; 44: 381-386.
28. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium – dependent vasodilation. *Circulation* 2000; 101: 2264 – 2270.
29. Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Nacional Academy Press, Washington DC, USA
30. Speziale A. El Laboratorio Clínico y la evaluación del riesgo coronario. *Rev Mex Patol Clin* 2000; 47: 202 – 218.
31. Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4: 11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.
32. Sary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1995; 15: 1512 – 1531.
33. González J, Figueira L, Reigosa A. Selectina-E, VCAM-1, FNT-a, IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 2008; 12: 50-57.
34. Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1454 – 1464.
35. Bravo M, Armas F, Cabrera M, González J, Pelayo T, González D, Reigosa A. Administración parenteral de homocisteína y efecto del ácido fólico en la formación de ateromas en conejos. *Salus* 2002; 6: 23-29.
36. Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb and Haemost*. 2005; 3: 1825-1834.
37. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann K, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.
38. Mohd N, Ghafar N, Jaarin K, Khine J, Top G. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed cholesterol – rich diet. *Int J Food Sci Nutr* 2000; 51, S79 – S94.
39. Forgione M, Cap A, Liao R, Moldovan N, Eberhardt P, Lim C, Jones J, Goldschmidt P, Loscalzo J. Heterozygous cellular glutathione peroxidase Deficiency in the Mouse. *Circulation* 2002; 106: 1154 – 1158.
40. De Haan J, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea R, Cheung N, Bronson R, Silvestro M, Wild S, Zheng S, Beart P, Hertzog P, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1998; 273: 22528 –22536.
41. Cowan D, Weisel R, Williams W, Mickle D. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 26904-26910.
42. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein C, Ho Y, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1131-1138.
43. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.
44. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore A, Napolitano A, Di Ilio C, Cuccurullo F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 1930-1934.
45. Blankenberg S, Rupprecht H, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner K. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 1605-1613.
46. Jialal I, Vega G, Grundy S. Physiological levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82: 185 – 191.
47. Levine G, Frei B, Koulouris S, Gerhard M, Keaney J, Vita J. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93: 1107 – 1113.



Efecto del ayuno y hora de toma de muestras sobre las determinaciones en química clínica

Bustamante Y.* , Rodríguez R.¹ , Rodríguez J.¹ , Briones N.¹

Recibido: 9 Noviembre 2009; Aceptado: 8 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

Las determinaciones realizadas en laboratorios clínicos deben considerar las variaciones propias de muestras biológicas sólo por ser parte de un sistema complejo. El presente trabajo estudió el efecto del ayuno y hora (h) de toma de muestra en determinaciones de glucosa, urea, creatinina, colesterol, triglicéridos, HDL-colesterol, LDL-colesterol, proteínas, albúmina y ácido úrico. Método: Se conformó una muestra con 31 personas de Caracas con edades entre 18 y 54 años. A cada una se le tomó dos muestras de sangre: una a las 7am (ayuno 12h) y otra (diferente día) a la 1pm (ayuno 6h, desayuno 7am estandarizado). Las muestras se procesaron en Konelab-20. Se comprobó la normalidad de las distribuciones y se compararon los grupos según el ayuno realizado, todo bajo técnicas de estadística inferencial en SPSS 12.0. Resultados: no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las muestras tomadas con ayuno de 12h y 6h en Glucosa, Proteínas totales, albúmina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, HDL colesterol y LDL-colesterol, no así para el caso de creatinina y urea, donde se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Conclusiones: No existe variación de los resultados en un mismo paciente, con dos muestras tomadas a diferentes horas, una en la mañana con 12 h de ayuno y otra, en la tarde con 6h de ayuno para el colesterol, triglicéridos, fracciones lipídicas, proteínas, albúmina, ácido úrico y glucosa. En el caso de urea y creatinina, existen diferencias significativas, por lo que se recomienda establecer intervalos de referencia biológicos para las determinaciones realizadas con 6h de ayuno.

Palabras clave: Variabilidad biológica, ayuno, Intervalos de Referencia Biológicos.

Effect of the fasting and capture sample hour on clinical chemistry determinations

SUMMARY

The determinations realized in clinical laboratories must consider the individual variations of biological samples, only for being a part of a complex system. The present work studied the effect of the fasting and hour (h) of capture of samples in determinations of glucose, urea, creatinina, cholesterol, triglicéridos, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, proteins, albumen and uric acid. Method: We studied a sample of 31 persons from Caracas with ages between 18 and 54 years. To each one was drawn two samples of blood: one at 7am (12h fasting) and the other a different day at 1pm (6h fasting, post standardized breakfast at 7am). The samples were tested in a Konelab-20. The normality of the distributions was verified and the groups and were compared according to the fasting, under tests of statistics inferencial in SPSS 12.0. Results: no significant differences found ($p > 0,05$) in the samples taken with fasting of 12h and 6h in HDL, Glucose, Total Proteins, albumen, uric acid, cholesterol, triglicéridos, cholesterol and LDL-cholesterol, this was not the case for creatinina and urea, where significant differences were observed ($p < 0,05$). Conclusions: variation of the results does not exist in the same patient, with two samples taken at different hours, one in the morning with 12 h of fasting and other one, in the evening with 6h of fasting for the cholesterol, triglicéridos, lipidic fractions, proteins, albumen, uric acid and glucose. In case of urea and creatinina, significant differences exist, so we recommend establishing reference biological intervals for the determinations of these components realized with 6h of fasting

Key words: Biological variability, fasting, Biological Intervals of Reference.

* Solicitar copia a: yacelli@gmail.com

¹. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Introducción

La variabilidad biológica está producida por factores de tipo fisiológico y patológico. Los principales factores que influyen en la variabilidad fisiológica son aquellos de tipo metabólico, genético y ambiental. La variabilidad patológica es aquella que se produce como consecuencia de la enfermedad. Muchos analitos en el laboratorio clínico pueden variar durante el tiempo de vida de un individuo sencillamente por los factores biológicos naturales involucrados en el proceso de "envejecimiento" (1).

La variabilidad biológica de las magnitudes bioquímicas se debe a diversos factores de variación. Algunos de estos factores son inherentes al individuo y es muy difícil que pueda modificarlos, como el sexo o la edad, mientras que otros pueden ser controlados por él mismo, como lo son la ingesta de alimentos. Entre los principales factores de variación biológica se incluyen sexo, raza, edad, ritmos biológicos, embarazo, alimentación, ayuno, etc. Así por ejemplo, la ingesta de ciertos alimentos o el cambio de hábitos de vida pueden producir variaciones en una magnitud de un mismo individuo en distintos momentos (2).

Se recomienda que los pacientes deben tener un ayuno de 10 a 12 horas. Un ayuno prolongado, además de hipoglucemia, produce cambios en diversos analitos, particularmente en el funcionamiento hepático: hiperbilirrubinemia, hipoproteinemia, incremento de ácidos grasos y de aminoácidos (3).

El conocimiento de todas las causas de variabilidad de los resultados es imprescindible para la correcta interpretación de los valores de las magnitudes bioquímicas observadas en los pacientes y para el establecimiento de intervalos de referencia (2). Los valores de referencia de magnitudes biológicas pueden estar asociados con condiciones de salud o con cualquier otra condición fisiológica o patológica y pueden ser usados por diferentes razones (4).

La variabilidad biológica trajo consigo grandes interrogantes en los analistas al estudiar una determinada población que aparentemente presentó características similares. Mucho más aún, si consideramos que en la mayoría de los laboratorios de nuestro país, realizan determinaciones de la química clínica en diferentes condiciones, como lo son ayuno de diferentes horas (12 horas o 6 horas) o toma en diferentes momentos del día. Lo grave no es esto, sino cómo interpretamos dichos resultados basados en los mismos intervalos de referencia biológicos para cada condición sin distinción.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tuvo como finalidad estudiar el efecto de las horas de ayuno en un grupo

de individuos aparentemente sanos en el Servicio de Bioanálisis del Instituto Médico "Dr. José Gregorio Hernández", del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, en la ciudad de Caracas, Venezuela.

Materiales y Métodos

La muestra estuvo representada por 31 personas aparentemente sanas provenientes del Distrito Capital, mayores de edad (entre 18 y 54 años), de diferente ocupación, en total 15 mujeres y 16 hombres, que fueron consultados y que aceptaron la participación en el estudio por medio de aprobación y firma según consentimiento informado preparado por los autores y revisado por la Comisión de Pasantías Hospitalarias de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela.

La etapa de muestreo se realizó durante los meses de enero y febrero de 2008. Fueron excluidas aquellas personas con dislipidemia, anemia, trastornos de la coagulación, fumadores, post menopausia y con consumo de alcohol superior a tres veces por semana.

A cada persona se le tomó dos muestras de sangre venosa a diferentes horas y en diferentes días, una en la mañana con 12 horas de ayuno y otra en la tarde con 6 horas de ayuno y desayuno estandarizado que consistió en dos paquetes de galletas de soda y un envase de jugo de frutas (comercial) de 250mL.

Cada una de las muestras fue analizada en autoanalizador Konelab-20, previa verificación de la calidad analítica, para determinar para glucosa, urea, creatinina, colesterol, triglicéridos, HDL-colesterol, LDL-colesterol, proteínas, albúmina y ácido úrico. Con los dos grupos se comprobó la normalidad de las distribuciones utilizando la prueba Kolmogorov-Smirnov y se compararon los grupos según el ayuno realizado utilizando la t pareada, todo bajo técnicas de estadística inferencial en SPSS 12.0.

Resultados

Los datos obtenidos se utilizaron para comprobar la variación de los resultados en un mismo paciente, con dos muestras tomadas a diferentes horas, una en la mañana (7:00 a.m.) con 12 horas de ayuno y otra en la tarde (1:00 p.m.) con 6 horas de ayuno y desayuno estandarizado (suministrado a las 7:00 a.m.). Se realizó el análisis estadístico para comprobar la normalidad de las muestras a través de la prueba Kolmogorov-Smirnov, obteniéndose que en ninguno de los ensayos existe diferencia significativa ($p > 0,05$) con la distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas paramétricas para los siguientes análisis estadísticos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los p valores para la prueba Kolmogorov-Smirnov (2 colas) para comprobar la normalidad de los datos.

Ensayo	p valor*	
	Muestra A.M.	Muestra P.M.
GLUCOSA	0.820	0.504
UREA	0.959	0.811
CREATININA	0.269	0.367
PROTEINAS TOTALES	0.989	0.923
ALBUMINA	0.966	0.985
ACIDO URICO	0.996	0.975
COLESTEROL	0.956	0.831
TRIGLICERIDO	0.398	0.192
HDL	0.862	0.921
LDL	0.997	0.999

* 2 colas, 95% confianza.

Se utilizó la prueba paramétrica t pareada para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los ensayos luego de ser tomados en diferentes horas (ritmo circadiano) y ayuno (12 horas o 6 horas). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los ensayos de glucosa, proteínas totales, albúmina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, HDL colesterol y LDL-colesterol, no así para el caso de marcadores de funcionamiento renal creatinina y urea, donde sí se observaron diferencias significativas para ambos casos ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los p valores para la prueba t de muestras pareadas.

Ensayos pareados	t*	p valor
GLUCOSA AM - GLUCOSA PM	0.873	0.389
UREA AM - UREA PM	5.150	0.000
CREATININA AM - CREATININA PM	3.503	0.001
PROTEINAS TOTALES AM - PROTEINAS TOTALES PM	-1.640	0.112
ALBUMINA AM - ALBUMINA PM	-0.377	0.709
ACIDO URICO AM - ACIDO URICO PM	0.173	0.863
COLESTEROL AM - COLESTEROL PM	0.070	0.945
TRIGLICERIDO AM - TRIGLICERIDO PM	-1.081	0.288
HDL AM - HDL PM	-0.269	0.790
LDL AM - LDL PM	0.883	0.384

* Para grados de libertad= 30, 2 colas, 95% confianza.

Discusión

Los estudios cronológicos y biológicos han demostrado fehacientemente que los límites de referencia son susceptibles a enormes variaciones, dependientes de múltiples factores dentro de los que sobresale el tiempo. El tiempo influye en las

pruebas de laboratorio a lo largo del día por efecto de los ritmos circadianos (5).

En el caso de creatinina donde se obtienen diferencias significativas entre las muestras tomadas en diferentes condiciones de tiempo (ritmo circadiano) y ayuno (12 horas o 6 horas), un total de 15 pacientes de los 31 analizados dieron el mismo resultado de creatinina en la muestra a.m. y en la p.m., cosa que no ocurrió con otras pruebas, además en los valores que sí variaron con diferencia estadísticamente significativa, notamos que ninguno cambia la condición del paciente y mucho menos la decisión clínica, ya que la creatinina es un marcador de funcionamiento renal sensible, es decir son los cambios abruptos los que se consideran signo de patología. A pesar de ello, es importante destacar que nuestro estudio fue realizado en pacientes aparentemente sanos.

Para la urea, pudimos observar que en 27 pacientes de los 31 totales, presentaron niveles de urea menores en la muestra p.m. que en la muestra a.m. y sólo cuatro con resultados contrarios (valores de urea menores en la muestra a.m. que en la p.m.) esto se explica por la dieta suministrada, ya que esta se encuentra baja en proteínas, fundamental para el origen de la urea y para mantener la regulación de la urogénesis, existe un control a largo plazo que está influido por el contenido en proteínas de la dieta, de tal modo que la actividad enzimática disminuye considerablemente en respuesta a dicha dieta pobre en proteínas, decaen las reservas lo que causa una disminución de la concentración de la uremia (6). Sin embargo, los cambios aportados, no producen cambios en el estado clínico del paciente ni la decisión clínica a tomar.

La duración del ayuno previo a la obtención del espécimen influye en la concentración plasmática de constituyentes bioquímicos como, por ejemplo, glucosa (7). En nuestra experiencia, en los ensayos sin diferencia significativa de las muestras tomadas a.m. y p.m., nos llamó la atención el caso de la glucosa, donde 3 pacientes presentaron resultados en las muestras tomadas a la 1:00 p.m. por debajo del intervalo de referencia biológico del Servicio de Bioanálisis del Instituto Médico Dr. José Gregorio Hernández, lo que podría llamar la atención por estados metabólicos que deberían ser estudiados.

Debido a nuestros resultados, recomendamos a los laboratorios que utilizan tomas de muestras a diferentes horas (en la mañana y en la tarde), que proporcionen al paciente instrucciones precisas de la dieta que deben seguir para las muestras tomadas a la 1pm y con 6 horas de ayuno. Asimismo, se recomienda establecer intervalos de referencia biológicos de urea y creatinina para las muestras tomadas bajo las condiciones descritas a la 1pm.

Conclusiones

No existe una variación de los resultados en un mismo paciente, con dos muestras tomadas a diferentes horas, una en la mañana con 12 horas de ayuno y otra en la tarde con 6 horas de ayuno y un desayuno estandarizados para el triglicéridos, colesterol y fracciones lipídicas, proteínas, albúmina, ácido úrico y glucosa, por lo tanto se podría aplicar ambos métodos en el laboratorio y tener la certeza de que no existirán diferencias significativas en los resultados informados a los clínicos, siempre que se garantice mediante la vigilancia que el paciente solo consuma la dieta recomendada.

Referencias

1. Smith Jay, Gerald R. Cooper. Myers, and Sampson Eric J. Biological Variability in Concentrations of Serum Lipids: Sources of Variation among Results from Published Studies and Composite Predicted Values. Clin. Chem 1993. 39/6: 1012-1022.
2. Fuentes Arderiu, X.; Castieiras Lacambra, M.J., y Queraltó Compañó, J.M. Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Volumen 2. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España; 1998.
3. Terrés-Speziale A.M. Incertidumbre y variabilidad total en el laboratorio clínico. Rev Mex Patol Clin 2006; 53(4):185-196.
4. NCCLS. How to define and determine intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. 2nd ed. NCCLS Document C28-A2. USA, 2000.
5. Terrés-Speziale A.M. Importancia de la variabilidad biológica y de la relevancia médica en la Norma ISO-15189. Rev Mex Patol Clin 2003; 50(3):118-128.
6. Herrera, E. Elementos de Bioquímica Clínica. 1ª Edición. Editorial McGraw-Hill. México, 1993.
7. Queraltó J. Teoría de los Valores de Referencia. Sociedad Española de Química Clínica (SEQC). Barcelona, España; 1997.