

Centro de Investigaciones Biomédicas

## **CARACTERIZACIÓN DE INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES QUEMADOS MUY GRAVES**

*Lic. Rosa Sánchez Álvarez, Dra. Niurka Llópiz Janer, Dra. Liliam Leyva, Lic. Yoani Albuerno, Dr. Félix Broche Valle, Lic. Marisol Peña Sánchez, Lic. Yuladis González Fresneda y Dr. José C. García Piñeiro*

### **RESUMEN**

Se caracterizó el comportamiento de algunos indicadores de estrés oxidativo sistémico en 33 pacientes quemados muy graves, y se tomaron muestras de sangre venosa durante 4 puntos experimentales a partir de su admisión. Se cuantificaron las concentraciones de malonildialdehído, productos de oxidación de las proteínas, vitamina A y  $\beta$  carotenos así como la actividad superóxido dismutasa, catalasa, fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), elastasa y el porcentaje de inhibición de tripsina. En los pacientes quemados las concentraciones de malonildialdehído fueron mayores respecto al control en todos los tiempos. De igual manera se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes fallecidos y los sobrevivientes, y resultaron siempre mayores los valores de este indicador en los primeros. Las proteínas, también dianas del daño oxidativo, en general se encontraron elevadas en los pacientes quemados con respecto al control. La actividad de las enzimas FLA<sub>2</sub> y elastasa fue mayor en los pacientes quemados que en los sujetos supuestamente sanos. Contrario a esto, la superóxido dismutasa exhibió una mayor actividad en estos últimos, sin mostrarse diferencias significativas con respecto a los pacientes quemados no fallecidos en los días 3 y 14. La actividad de la catalasa fue mayor en todos los tiempos de estudio en los pacientes que fallecieron respecto al control y a los que sobrevivieron a la agresión térmica. Estos últimos no fueron significativamente diferentes del control. Los valores de vitamina A fueron superiores en los pacientes quemados mientras que las concentraciones de  $\beta$  carotenos fueron menores. El porcentaje de inhibición de tripsina fue mayor en los pacientes que no fallecieron respecto a los fallecidos y a los individuos que integraron el grupo control, este aumento fue significativo en los días 3 y 7. Los resultados permiten concluir que los indicadores de daño oxidativo aumentan en el paciente quemado muy grave y que los indicadores bioquímicos de defensa antioxidante se modifican con el tiempo de evolución.

*Descriptor DeCS:* INDICADORES Y REACTIVOS; ESTRES OXIDATIVO; QUEMADURAS/ enzimología; QUEMADURAS/ quimioterapia; PEROXIDACION DE LIPIDOS; FOSFOLIPASAS A/ analysis; SUPEROXIDO DISMUTASA/ analysis; CATALASA/ analysis; PANCREATOPEPTIDASA/ analisis; ALFA 1- ANTITRIPSINA/ analisis; ANTIOXIDANTES/ uso terapeutico; MALONILDIALDEHIDO/analysis.

Las quemaduras son lesiones traumáticas que pueden complicarse y poner en peligro la vida del paciente como resultado de los procesos fisiopatológicos complejos que se presentan. Cuando la extensión de la quemadura rebasa ciertos límites, esta deja de ser un trastorno local para convertirse en la "enfermedad por quemaduras" que requiere un manejo especial desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Hoy día se reconoce la participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en los mecanismos de daño celular local y sistémico en el paciente quemado, aspecto que comienza a ser considerado en las estrategias de diagnóstico y pronóstico de esta entidad lo que, de hecho, constituye una contribución de la bioquímica clínica a la práctica asistencial intensiva que requieren estos pacientes.

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el comportamiento de algunos indicadores de estrés oxidativo sistémico en pacientes quemados muy graves del área urbana de la ciudad de La Habana que fueron admitidos en la Unidad de Quemados del Hospital General Docente "Calixto García".

## **MÉTODOS**

Se tomaron muestras de sangre venosa de 33 pacientes durante 4 puntos experimentales a partir de la admisión de estos. Se cuantificaron las concentraciones de malonildialdehído (MDA), productos de oxidación de las proteínas, vitamina A y  $\beta$  carotenos así como la actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), elastasa y el porcentaje de inhibición de tripsina según los *procederes operacionales normalizados* en la División de Estrés oxidativo del Centro de Investigaciones Biomédicas.<sup>1-7</sup> Los resultados se procesaron mediante métodos

paramétricos y se compararon con los obtenidos en el grupo control.

## **RESULTADOS**

En los pacientes quemados las concentraciones de MDA fueron mayores respecto al control en todos los tiempos. De igual manera se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes fallecidos y los sobrevivientes, siempre resultaron mayores los valores de este indicador en los primeros.

Las proteínas, también dianas del daño oxidativo, en general se encontraron elevadas en los pacientes quemados con respecto al control.

En el comportamiento de la actividad enzimática de la FLA<sub>2</sub> se puede observar un incremento significativo de la actividad de esta enzima en los pacientes quemados respecto al control.

Se verificó un aumento significativo de la actividad de la elastasa y que en todos los tiempos el porcentaje de inhibición de tripsina fue significativamente mayor en los pacientes fallecidos que en los no fallecidos.

En este trabajo se encontró una disminución de los valores de actividad SOD en los pacientes quemados respecto al control, y resultó significativa en los pacientes fallecidos en todos los tiempos de estudio, lo que pudo ser un reflejo del compromiso celular que presentaban; sin embargo, en los pacientes que sobrevivieron, la disminución no fue significativa en los días 3 y 14, lo que es una evidencia de su evolución satisfactoria.

El comportamiento para la CAT muestra que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes quemados excepto en el tiempo 0 en el grupo de pacientes que no sobrevivieron; ello pudiera asociarse con su actividad peroxidasa, lo que se corresponde con los altos niveles

de MDA, más que con su acción catalítica sobre el  $H_2O_2$ .

Se pudo constatar que en los pacientes quemados los valores de vitamina A fueron superiores al control mientras que los  $\beta$  carotenos manifestaron un comportamiento inverso.

## **DISCUSIÓN**

Estudios realizados en animales y humanos revelan que los niveles de peróxidos lipídicos aumentan considerablemente cuando la piel se inflama o es quemada, lo que ocurre como resultado del daño que sufren las membranas celulares que se componen fundamentalmente de fosfolípidos.<sup>8</sup>

Los niveles de MDA en los pacientes quemados no fallecidos se relacionan con su evolución clínica, lo que puede ser una respuesta a la vitaminoterapia que se aplica en las unidades de cuidados intensivos del país. El aumento en el último tiempo de estudio de la concentración de MDA pudiera estar asociado con la presencia de sepsis, segunda agresión que es común en los pacientes con lesiones graves y es un indicador sensible de evolución clínica.

En pacientes con quemaduras superficiales se ha encontrado un incremento de los productos de oxidación de proteínas al ser comparados con voluntarios sanos, esto se corresponde con los resultados experimentales de este trabajo. Sin embargo, al tercer día se observó una disminución que no fue significativamente diferente al comparar los valores con los del grupo control, que pudo ser resultado de la hemodilución y la vitaminoterapia.

La formación de lipoperóxidos es determinante en el mecanismo de daño panendotelial, pues su aumento produce modificaciones de las proteínas asociadas con las membranas. Esto provoca trastornos en los sistemas transportadores con aumento de la permeabilidad para algunos

elementos como el calcio lo que a su vez activa la FLA<sub>2</sub>.<sup>9</sup> Existen numerosas evidencias que sugieren que esta enzima desempeña un papel importante en la inflamación mediante la generación de precursores para la síntesis de eicosanoides.<sup>10</sup>

El aumento de la fluidez y permeabilidad de las membranas que se produce posterior al desafío oxidativo ocasiona fragilidad lisosomal y celular, que finalmente conduce al vertimiento de las enzimas lisosomales y citoplasmáticas al líquido intersticial. Uno de estos productos lisosomales es la elastasa, enzima que existe en el plasma y forma un complejo con el inhibidor de proteasa alfa ( $\alpha 1$ ); su aumento es índice de la degranulación de los polimorfonucleares. Se ha hallado un incremento de los niveles séricos del complejo elastasa-inhibidor  $\alpha 1$  en casos de sepsis en humanos.<sup>11</sup>

La actividad proteolítica se incrementa en pacientes pediátricos quemados.<sup>12</sup> Este incremento se correlaciona con el porcentaje total de superficie corporal quemada y se asocia con el incremento de la susceptibilidad a contraer infecciones fatales. Estos autores concluyen que en estos pacientes la elevación de la actividad proteolítica total se debe a la disminución de los inhibidores de proteasas y al aumento y la activación de las enzimas proteolíticas. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el presente estudio, tanto para la elastasa como para los inhibidores de tripsina, relación que es posible establecer teniendo en cuenta que la  $\alpha 1$  antitripsina es el principal inhibidor de tripsina en plasma y se le ha reconocido actividad antielastasa.

Los resultados permiten concluir que los indicadores de daño oxidativo aumentan en el paciente quemado muy grave y que los indicadores bioquímicos de defensa antioxidante se modifican con el tiempo de evolución.

## **SUMMARY**

The behaviour of some indicators of systemic oxidative stress was characterized in 33 very critical burned patients. Samples of venous blood were taken during 4 experimental points starting from their admission. The concentrations of malondialdehyde, the products of protein oxidation, vitamin A and B carotenes, as well as the superoxide dismutase, catalase, phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and elastase activity and the percentage of tripsyn inhibition were quantified. The concentrations of malondialdehyde were higher in the burned patients than in the controls all the time. Likewise, statistically significant differences were observed between the dead patients and the survivors. The values of this indicator were always higher in the first. Proteins, which are also targets of the oxidative damage, were generally elevated in burned patients compared with the controls. The activity of the PLA<sub>2</sub> enzymes and elastase was greater in burned patients than in the apparently sound. On the contrary, the superoxide dismutase had a higher activity in the latter. No significant differences were observed among the burned patients who had not died on the 3rd and 14th day. The catalase activity during the study was higher among the patients who died than in the control group and in those who survived the thermal aggression. The latter were not significantly different from the control group. The values of vitamin A were higher in burned patients, whereas the concentrations of B carotenes were lower. The percentage of inhibition of tripsyn was higher among those patients that did not die compared with the dead and with the individuals from the control group. This increase was remarkable on the 3rd and 7th day. The results allowed to conclude that the indicators of oxidative damage are higher in the very severe burned patient and that the biochemical indicators of antioxidant defense change according to the time of evolution.

*Subject headings:* INDICATORS AND REAGENTS; OXIDATIVE STRESS; BURNS/enzymology; BURNS/drug therapy; LIPID PEROXIDATION; PHOSPHOLIPASES A/analysis; SUPEROXIDE DISMUTASE/analysis; CATALASE/analysis; PANCREATOPEPTIDASE/analysis; ALPHA 1 ANTITRYPSIN/analysis; ANTIOXIDANTS/therapeutic use; MALONDIALDEHYDE/analysis.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Kunio Y. Chemistry and Physics of Lipids 45:337-351. 1990.
2. Reznick AZ, Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Method for Carbonyl Assay. J Biol Chem 1991;266:2005.
3. Raduany F, Lobo de Araujo A. Determination of phospholipase A<sub>2</sub> activity by colorimetric assay using a Ph indicator. Toxicol 1987;25(11):1181-8.
4. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pirogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1987;47:469-74.
5. Beers RF, Sizer LWA. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 1989.
6. Natelson S. Microtécnicas de Química Analítica. 1964.
7. Perlmann GE, Lorent L. Methods in Enzymology. Volumen XIX Proteolytic Enzymes (1970).
8. Wooliscroft J, Prasad J, Thompson P. Metabolic Alterations in Burn Patients: Detection of Adenosine Triphosphate. Degradation Products and Lipid Peroxides. Burns 1990;16:92-6.
9. Ginsburg I, Kohen R. Synergistic effects among oxidants, membrane-damaging agents, fatty acids, proteinases and xenobiotics: killing of epithelial cells and the release of arachidonic acid. Inflammation 1995;19:101-18.
10. Bobryshev Y, Crozier J, Reginald SA. Expression of secretory groups II Phospholipase A<sub>2</sub> by CD1a positive cells in human atherosclerotic plaques. Atherosclerosis 1996;127:283-5.
11. Ginsburg I. Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial hemolysins and cytokines be the main cause of tissue damage in infection and inflammatory conditions. Medical Hypotheses 1998;51:337-46.
12. Neely AN, Warden GD, Rieman M, Friedberg DL, Holder LA. Components of the increased circulating proteolytic activity in pediatric burn patients. J Trauma 1992;33(6):807-12.

Recibido: 3 de abril del 2000. Aprobado: 27 de junio del 2000.

Lic. *Rosa Sánchez Álvarez*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102, esquina 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.