



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Posgrado en Ciencias Biológicas

Inhibición de lipoperoxidación y daño a proteínas en eritrocitos
por extractos de frutas, bajo estrés oxidante
in vitro

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

MARLEN ESPINDOLA LOZANO

Director de tesis

DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE

Tlaxcala, Tlaxcala.

Noviembre, 2015



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Inhibición de lipoperoxidación y daño a proteínas en eritrocitos
por extractos de frutas, bajo estrés oxidante

in vitro

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

MARLEN ESPINDOLA LOZANO

Comité tutorial

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Mariana Domínguez López

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2015



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

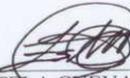
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Marlen Espíndola Lozano** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Inhibición de lipoperoxidación y daño a proteínas en eritrocitos por extracto de frutas bajo estrés oxidante in vitro”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

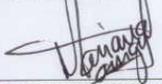
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 15 DE 2015



DR. DANIEL MENDEZ ITURBIDE



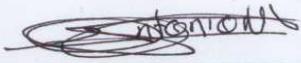
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DRA. MARIANA DOMINGUEZ LOPEZ



DRA. MARIA DEL CARMEN SANCHEZ HERNANDEZ



M. EN C. ANTONIO NIETO CAMACHO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

El sustentante y el grupo de investigación del laboratorio de Química de la Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, agradece al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la conducta (CTBC UATx), el apoyo recibido durante el desarrollo de esta tesis.

A CONACYT, por el apoyo de la beca académica No. 367400, CVU 553618.

Al Dr. Daniel Méndez Iturbide por los conocimientos brindados, por su orientación, persistencia, paciencia y motivación hacia este trabajo.

A la Dra. Estela Cuevas Romero quien superviso los avances de este proyecto, aportando conocimientos valiosos.

A la Dra. Mariana Domínguez López cuyos consejos sirvieron para salir adelante y llevar a buen fin el presente trabajo, así como, el apoyo durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

GRACIAS POR SU TIEMPO, POR SU APOYO ASÍ COMO POR LA SABIDURÍA QUE ME TRANSMITIERON EN EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida; por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar las cosas cada día más.

A mis padres Lidia Lozano Romero y Filiberto Espindola Cortes, por acompañarme durante todo mi trayecto estudiantil y de vida; por sus consejos y su apoyo incondicional. Agradezco la confianza y el esfuerzo que hacen día a día para brindarme lo mejor. Me han demostrado su amor infinito, han corregido mis faltas y celebrado mis triunfos. Gracias por todo!

A mis hermanos Claudia Espindola Lozano y Luis Alberto Espindola Lozano, por sus consejos, por su apoyo y por la alegría que brindan a mi vida.

A la Dra. Margarita Cervantes y el Dr. José Antonio Banderas por su apoyo y consejos valiosos y llenos de sabiduría, gracias por todo lo que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio, voy a extrañarlos.

A Leobardo González Barraza, por sus palabras, por la confianza, por su amor y apoyo incondicional. Gracias por ayudarme a estudiar, por las desveladas, las risas y por tu paciencia. Gracias por impulsarme para ser mejor cada día; eres un gran apoyo en mi vida. Gracias!

A mis compañeros y amigos de la Maestría, Gabriela, Rosabel, Sandra, Ángel, Alberto y Luis, por el apoyo en clases, por las tonterías que los caracterizan, por las risas, por las fiestas, los enojos y sobre todo por su amistad. Me alegra contar con personas como ustedes.

A Pablo Amando Cruz Martínez por llenarme de sabiduría solo con su presencia (jajaja), gracias por tu amistad, extrañare los viajes en el Ferrari.

A Yoselin por el apoyo en el laboratorio, gracias por ayudarme a realizar mis geles de electroforesis, por ayudarme a hacer mi tarea de inglés, por ayudarme a destilar solventes; jaja por mil cosas, pero sobre todo mil gracias por tu amistad.

A mis compañeras de laboratorio, Alejandra, Erika, Rosaura, Anilu, Navid, Paty; por hacer mi estancia más amena, sin ustedes el laboratorio no sería lo mismo.

RESUMEN

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células, este entorno es preservado por las enzimas a través de un constante aporte de energía metabólica, desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Los radicales libres tienen una configuración electrónica con al menos un electrón desapareado, que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula.

Para contrarrestar los efectos de los radicales libres, las células producen su propio sistema antioxidante por medio de enzimas. Se ha demostrado en estudios clínicos, que el consumo de antioxidantes naturales de frutos y vegetales disminuye el estrés oxidante como: extractos de manzana con alto contenido de polifenoles, de igual manera con suplementos alimenticios ricos en antioxidantes. En este proyecto se evaluó la inhibición del daño a proteínas mediante electroforesis, también se evaluó la inhibición de la lipoperoxidación de la membrana del eritrocito por medio de la cuantificación de MDA (producto final de la lipoperoxidación). Se utilizaron como fuente de antioxidantes dos extractos previamente analizados; el tejocote (*Crataegus mexicana*) y manzana califonia (*Malus domestica*).

El grupo de investigación de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala ha realizado diversos estudios de la epidermis de tejocote y manzana califonia como fuente de antioxidantes por medio de los diferentes métodos colorimétricos, reportando una alta capacidad antioxidante por extractos de acetona, acetato de etilo y metanol.

En este proyecto se desarrollaron diferentes técnicas como la electroforesis con el objetivo de observar la protección de los extractos sobre las proteínas del eritrocito humano; se observó una mayor protección del extracto de tejocote a concentración de 100 mg/L en un tiempo de incubación de 7 días.

Otra prueba que se realizó fue la cuantificación de la liberación de hemoglobina en diferentes días, así mismo, se observó que el extracto de tejocote retarda el proceso de hemolisis en el

eritrocito, el periodo de incubación fue de 7 días. Una prueba adicional fue la realización de extendidos citológicos, los cuales nos permitieron observar a nivel microscópico los cambios morfológicos y cinéticos que los eritrocitos sufrieron en un periodo de 28 días, aunque, cabe resaltar que solo se reportaron los días 0 y 7 de incubación.

Respecto a la cuantificación de productos finales de la lipoperoxidación como el malondialdehido (MDA) por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se observó una protección mayor en los extractos de tejocote; ya que se liberó menos MDA en los tubos que lo contenían a diferencia del extracto de manzana.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Radicales libres	2
2.1.1 Biomecanismos de formación de radicales libres	3
2.1.2 Clasificación de los radicales libres del oxígeno	4
2.1.3 Daño biomolecular por radicales libres	6
2.1.4 Radicales libres y su papel en la lipoperoxidación	10
2.1.5 Productos finales derivados de la lipoperoxidación	11
2.1.6 Radicales libres y su papel en la oxidación de proteínas	13
2.2 Métodos de análisis de productos finales del estrés oxidante	14
2.2.1 Técnica de separación de moléculas: electroforesis	15
2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	17
2.3 Modelo biológico de estudio: el eritrocito	19
2.3.1 Mecanismo de formación de los eritrocitos	19
2.3.2 Morfología del eritrocito	20
2.3.3 Mecanismo de oxidación del eritrocito	21
2.4 Antioxidantes	22
2.4.1 Efectos de los antioxidantes en el organismo	23
2.5 Descripción del fruto: tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>)	24
2.5.1. Origen	25
2.5.2. Clasificación taxonómica	25
2.5.3 Antecedentes como antioxidante del fruto de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i>)	26
2.6 Descripción del fruto: manzana californiana (<i>Malus domestica</i>)	27
2.6.1 Origen	29
2.6.2 Antecedentes de manzana (<i>Malus domestica</i>) como antioxidante	29
2.7. Extracción de metabolitos	31
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33

5. OBJETIVOS	34
6. METODOLOGÍA	35
6.1 Ubicación y espacio	35
6.2 Tipo de estudio.....	35
6.3 Tipo de diseño experimental.....	35
6.4 Obtención de extracto de frutas	35
6.5 Obtención de sangre.....	36
6.6 Manejo y preparación de las muestras de sangre.....	36
6.7 Consideraciones bioéticas.....	37
6.8 Técnicas de análisis de lipoperoxidación y daño a proteínas	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Recolección del fruto	39
7.2 Extractos	39
7.3 Obtención de los eritrocitos	40
7.4 Determinación de inhibición de daño a proteínas en geles SDS- PAGE.....	40
7.5 Conteo de bandas de proteínas en geles de diferentes días.....	49
7.6 Cuantificación de MDA por cromatografía de alta resolución (HPLC).....	63
8. DISCUSION DE RESULTADOS	83
9. CONCLUSIONES	89
10. BIBLIOGRAFÍA	91
11. ANEXOS	97

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidante es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante [1,2]. En términos químicos, en un sistema biológico, el estrés oxidante es un aumento en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión [3,4]. Los radicales libres tienen una configuración electrónica donde al menos un electrón desapareado es muy susceptible a crear un enlace con otro átomo o molécula, atacando principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, así como, a las lipoproteínas del eritrocito transformándolas en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento en su cadena lateral liberando malondialdehído (MDA) [5,6]. Una técnica para su determinación se basa en la medición de este compuesto ya sea por High Performance Liquid Chromatography (HPLC) o por técnicas espectrofotométricas.

Para contrarrestar los efectos de los radicales libres, las células producen su propio sistema antioxidante por medio de enzimas. Se ha demostrado en estudios clínicos, que el consumo de antioxidantes naturales de frutos y vegetales disminuye el estrés oxidante como: extractos de manzana con alto contenido de polifenoles, de igual manera con suplementos alimenticios ricos en antioxidantes [2]. Este proyecto propuso evaluar el daño a proteínas mediante electroforesis, también se evaluó la inhibición de la lipoperoxidación de la membrana del eritrocito por medio de la cuantificación de MDA (producto final de la lipoperoxidación), se utilizó FeSO_4 como inductor de estrés oxidante; este compuesto genera radicales libres derivados de oxígeno los cuales son muy estables. La cuantificación de MDA se realizó mediante por High Performance Liquid Chromatography (HPLC), utilizando extracto de tejocote (*Crataegus mexicana*) y manzana californiana (*Malus domestica*) como fuente de antioxidantes. Se esperaba que a mayor concentración se inhibiera en mayor porcentaje la lipoperoxidación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Radicales libres

Un radical libre es un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su estructura química, Los radicales libres pueden ser producidos en sistemas biológicos de diferentes maneras, tales como; la ruptura de enlaces covalentes, la pérdida de un electrón o ganando un electrón. La vida del radical libre es muy corto (milisegundos), pero este proceso continúa como una reacción en cadena generando un desequilibrio en el cuerpo [7, 8], en el cuadro 1 se presenta el tiempo aproximado en que los radicales libres permanecen sin reaccionar En un organismo normal la combustión química del metabolismo aerobio produce sustancias oxidantes altamente reactivas, tales como: el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2 , entre otras, que también pueden ser generados por factores como la contaminación ambiental, el consumo de tabaco, alimentos procesados, medicamentos o por la exposición a pesticidas. Actualmente se sabe que el estrés celular contribuye a procesos inflamatorios y disfunción endotelial, considerado este último como el factor de riesgo principal de enfermedades cardiovasculares [7]. Los radicales libres juegan un doble papel como compuestos tóxicos y beneficiosos ya que son utilizados por el sistema inmunitario como un medio para atacar y neutralizar a los patógenos, a través de la fagocitosis, también son utilizados en la señalización celular, denominada señalización redox.

Tabla 1. Tiempo aproximado de vida media de los radicales libres		
Especie		Vida media (seg)
Oxígeno molecular	O_2	$>10^2$
Oxígeno singulete	1O_2	10^{-5}
Anión superóxido	$O_2^{\cdot-}$	10^{-6}
Radical hidroxilo	$HO\cdot$	10^{-9}
Radical peróxido	$ROO\cdot$	7
Radical alcoxilo	$RO\cdot$	10^{-6}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	- (enzimático)
Óxido nítrico	$NO\cdot$	1-10
Peroxinitrito	$ONOO\cdot$	0.05-1

2.1.1 Biomecanismos de formación de radicales libres

Los radicales libres se producen generalmente en la célula a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical $\bullet\text{OH}$ que es generado siempre que el H_2O_2 entra en contacto con iones cobre (Cu) o iones hierro (Fe); ya que el H_2O_2 y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el $\bullet\text{OH}$ puede ser formado *in vivo* [9]. Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres: 1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula. 2. Pérdida de un protón de una molécula. 3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

Por otra parte más del 95% del O_2 consumido por las células en nuestro organismo es en sistemas acuosos, el citocromo oxidasa mitocondrial, lo reduce completamente a H_2O durante la respiración mitocondrial, pero un pequeño porcentaje (<5%) es convertido a ERO. Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de capturar el electrón de cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto, que llegue a afectar a los tejidos corporales [10]. En la Figura 1, se muestra el mecanismo de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial, que constituye la vía de formación de radicales libres derivados del oxígeno.

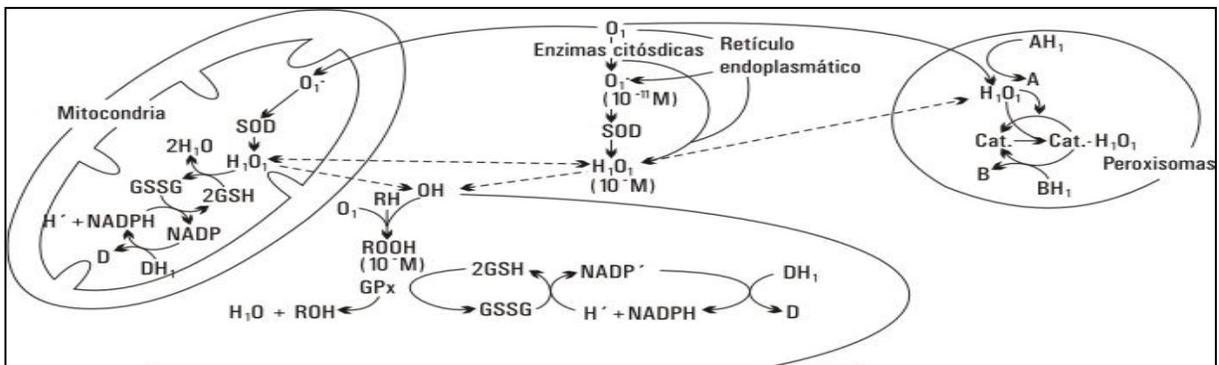


Figura 1. Formación de radicales libres en las mitocondrias.

2.1.2 Clasificación de los radicales libres del oxígeno

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidróxilo $\bullet OH$.
2. Radicales libres orgánicos o secundarios. Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Un ejemplo de este tipo de radicales es el óxido nítrico ($NO\bullet$).
3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, los hidroperóxidos orgánicos [11].

La capacidad prooxidante de cada radical libre está determinada por factores como: reactividad, especificidad, selectividad, de este modo, el radical hidroxilo reaccionará con cualquier molécula cercana, dada su elevada reactividad, baja especificidad y su peligro dependerá del compartimento celular en el que se origine o las moléculas a las que ataque. Especies menos reactivas, como el $O_2^{\cdot-}$, reaccionan con menor eficacia pero de forma mucho más específica y selectiva [12], afectando a enzimas como la xantino oxidasa y la aldehído oxidasa. Se ha observado su participación en numerosos procesos citotóxicos, a pesar de ser una especie menos reactiva que otros radicales. Tal parece que es un agente que no actúa directamente, sino que, al metabolizarse por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a H_2O_2

puede actuar por sí mismo como fuente de otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición [13].

Por otra parte, el representante más sobresaliente de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) es el óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), ya que interviene en diversas funciones biológicas, participa como factor relajante en el endotelio, el cual puede relajar la musculatura lisa vascular, inhibir la agregación plaquetaria y disminuir/inhibir la transmisión del mensaje neuronal; también es importante en la respuesta inmune, pues los macrófagos producen óxido nítrico como parte de sus mecanismos citotóxicos.

El $\text{NO}\bullet$ es producido en organismos superiores por la oxidación de una de las terminales de los átomos de nitrógeno-guanidino de la L-arginina, proceso catalizado por la enzima sintasa de óxido nítrico (SON), figura 2. Bajo ciertas condiciones el $\text{NO}\bullet$ puede ser convertido a otras ERN, tales como: el catión nitrosonio (NO^+), anión nitroxilo (NO^-), peroxinitrito (ONOO^-) y el dióxido de nitrógeno (NO_2). Algunos de los efectos fisiológicos son mediados a través de la formación intermediada de S-nitroso-cisteína o S-nitroso-glutatión [11,15].

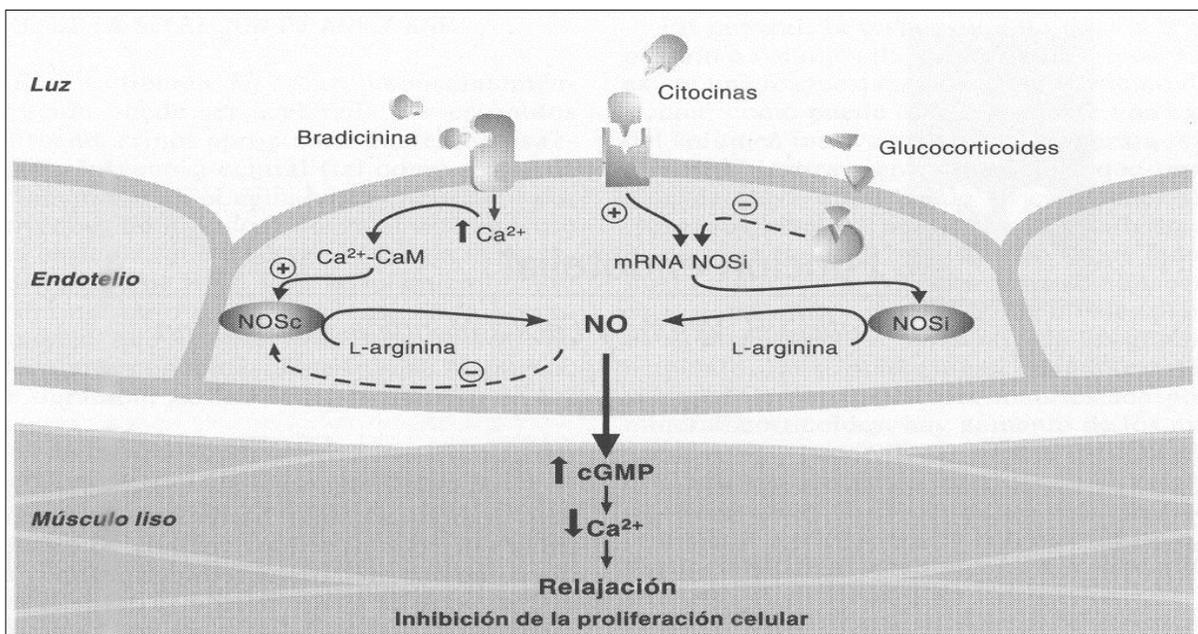


Figura 2. Formación de óxido nítrico

2.1.3 Daño oxidativo por radicales libres

Si bien es cierto que los radicales libres son elementos fundamentales en el metabolismo, también constituyen un riesgo, especialmente para las células y las biomoléculas, como los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y lípidos (figura 3). El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases nitrogenadas o a las pentosas que constituyen el ADN, formándose el radical piróxilo, lo que resulta en daños estructurales y diversas mutaciones, al mismo tiempo, todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (figura 3) [16].

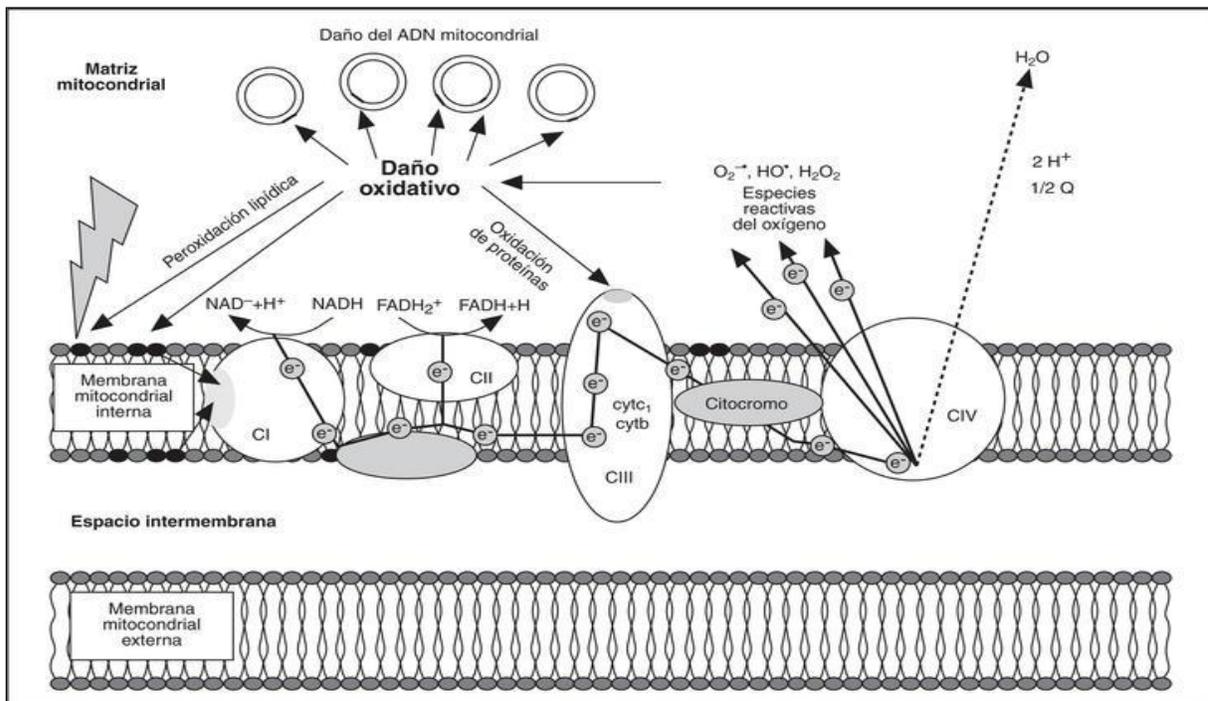


Figura 3. Daño provocado por radicales libre a biomoléculas

Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los más propensos a sufrir procesos oxidantes, esta oxidación puede generar un cambio conformacional de la proteína y como consecuencia la pérdida o modificación de su función biológica.

El daño oxidante suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína, en las enzimas, puede impedir su actividad catalizadora y en los polisacáridos, cuya función es estructural, ocasionando su ruptura, lo que da lugar a procesos degenerativos, un caso especial es el del ácido hialurónico, polisacárido, cuya función reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial.

La exposición a agentes oxidantes, sobre todo al radical superóxido, provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, alteración que ocurre en la artritis reumatoide, los lípidos, especialmente aquellos que contienen ácidos grasos poli-insaturados son especialmente susceptibles a desarrollar procesos de oxidación no controlados, el resultado es la pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, así como la pérdida de los gradientes iónicos a ambos lados de la membrana [17].

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas:

1. *Lípidos*. Es aquí donde se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular, la peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño que puede ser desencadenado por el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno, los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: a) La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador. b) Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad. c) La tensión de oxígeno. d) La presencia de hierro. e) El contenido celular de antioxidantes (β - carotenos, α - tocoferoles, glutatión). f) La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres

que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos.

2. Proteínas.

Las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Dependiendo de la ERO a la que se expongan las proteínas la oxidación puede ser específica (como en el caso de oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o con hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (como ocurre en la oxidación por radiación en la que se produce oxígeno en singulete).

La oxidación de proteínas también puede ser clasificada en reversible o irreversible, la oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox, como en el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación.

La oxidación irreversible de proteínas se da por medio de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con especies reactivas del oxígeno (EROs), algunos de los cuales son radicales libres generados por radiación ionizante y por oxidación catalizada por un metal.

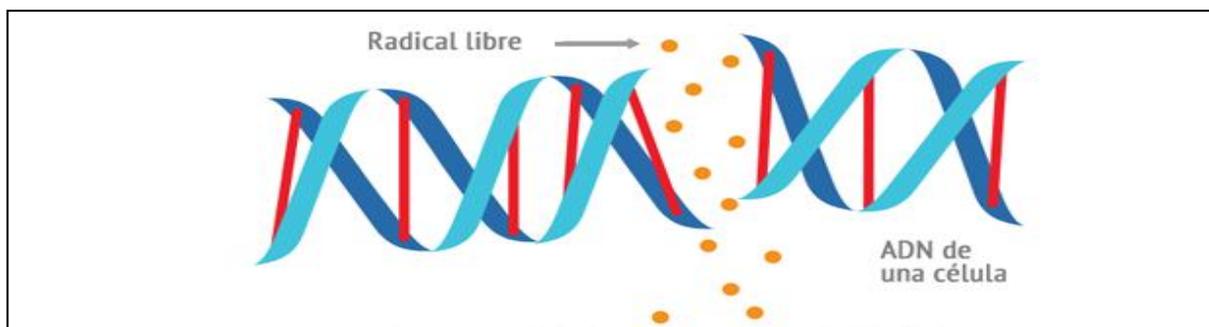
La radiación ionizante produce la radiólisis del agua lo cual forma radicales hidroxilo que al reaccionar con los hidrógenos de los carbonos α de la estructura central de las proteínas, generan radicales en carbonos relativamente estables (por deslocalización con los electrones en las funciones amida adyacentes). Alternativamente, el radical en carbono podría obtener un átomo de hidrógeno de algún grupo cercano, para generar un hidroperóxido que se descompone en un radical alcoxilo y finalmente produciría también la ruptura del enlace peptídico, en ausencia de oxígeno, un radical en el carbono puede reaccionar con otro igual para formar derivados proteína-proteína.

La oxidación catalizada por un metal se produce por reacción del H^2O^2 con un metal de transición (Fe^{2+}/Fe^{3+}) produciendo el radical hidroxilo $\cdot OH$ el cual, a su vez, reacciona con las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes al sitio de unión a metal de la proteína.

La localización de la reacción de oxidación proteica se debe a la alta reactividad del radical hidroxilo, el cual no se difunde fuera del sitio donde se genera, sino que reacciona inmediatamente con los residuos cercanos.

Existen modificaciones extensas en cadenas laterales de las proteínas, producto de la oxidación, entre ellas se encuentra la aparición de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas), oxidación de residuos de histidina a *oxo*-histidina y otros productos de degradación, de fenilalanina a *orto* y *meta*-tirosina, la conversión de metionina a metionin sulfóxido o la degradación oxidativa de triptofano a quinureninas [19].

3. *Ácido desoxirribonucleico* (ADN). Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores) que pueden conducir a la iniciación, progresión de la carcinogénesis, los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la



secuencia del ADN [20].

Figura 4. Daño en ADN producido por radicales libres.

2.1.4 Radicales libres y su papel en la lipoperoxidación

Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando algunos compuestos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), por lo que se considera que la concentración sérica de estos compuestos, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de lipoperoxidación (Fina, 2006). Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que les confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el $\cdot\text{OH}$ le sustraiga un átomo de hidrogeno. El proceso de oxidación de los ácidos grasos se denomina lipoperoxidación, por lo tanto el proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La etapa de iniciación se produce cuando la unión C-H de los AGP sufre la abstracción del hidrógeno de la doble ligadura (hidrógeno alílico) susceptible de ser abstraído por los radicales libres, fundamentalmente el $\cdot\text{OH}$, lo que genera un radical lipídico. Teniendo el átomo de Hidrógeno un solo electrón, la sustracción de Hidrogeno del grupo metileno produce un radical de ácido graso $\text{R}\cdot$ al dejar un electrón desapareado en el carbono. El inicio se expresa en la siguiente reacción: $\text{RH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$, donde $\text{RH} = \text{AGP}$ y $\text{R}\cdot = \text{radical de ácido graso}$. La fase siguiente, de propagación, comprende una etapa en la que el $\text{R}\cdot$ se combina con el oxígeno formando un lipoperóxido $\text{ROO}\cdot$. Este peróxido puede retirar un nuevo hidrógeno de otro carbono molecular. De esta manera, persiste el proceso auto catalítico que convierte el carbono del ácido graso de los fosfolípidos de membrana en hidroperóxidos $\text{ROO}\cdot$. La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a su término cuando dos ROOH reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes (figura 5) [20].

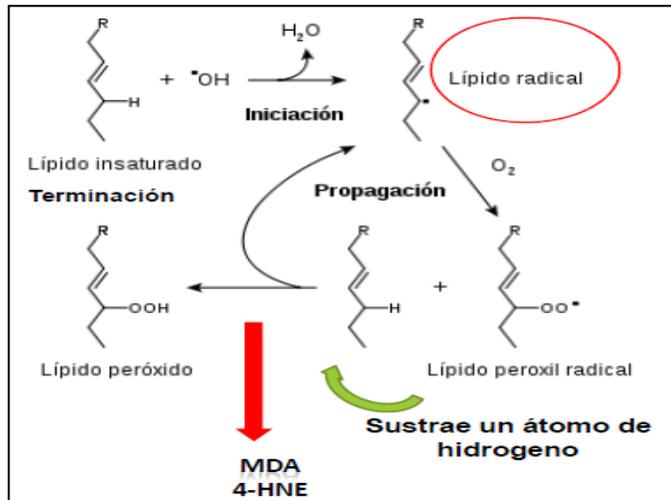


Figura 5. Etapas de la lipoperoxidación

2.1.5 Productos finales derivados de la lipoperoxidación

Existen diferentes productos de degradación metabólica de los lipoperóxidos, como los isoprostanos y los isómeros de las prostaglandinas producidos a partir del ácido araquidónico a través de una vía metabólica catalizada por radicales libres y que se eliminan principalmente por orina. Debido a la inestabilidad de los productos de la peroxidación lipídica, se determinan los productos de su degradación metabólica, constituidos por aldehídos de alta capacidad reactiva, siendo el más importante el malondialdehído (MDA) como se muestra en la tabla 2 [20].}

Tabla 2. Productos finales de la lipoperoxidación				
Substancia	Agente	Derivados	Producto de degradación metabólica	Producto final cuantificable
Peróxido lipídico ó Lipoperóxido	Lipoproteínas	Isoprostanos	Aldehídos (LOOH)	Malondialdehído (MDA) 4-hidroxinonal
Productos de Tirosinas	Mieloperoxidasa	Halogenación		Incremento en neutrófilos
Productos de Tirosinas	Mieloperoxidasa	Nitración	Sintasa óxido nítrico (iNOS) 3-nitrotirosina	Activación de macrófagos 3-nitrotirosina

2.5.1 El malondialdehído

El MDA es un aldehído que puede producir aductos pigmentados con varias sustancias, entre las que se encuentra el ácido tiobarbitúrico (TBA), la reacción entre el MDA y el TBA produce un pigmento rosa con una absorción molar de 5 a 10 veces mayor que el MDA solo.

El malondialdehído es un isoprostano derivado de la peroxidación de los lípidos cuyo producto final es un aldehído, se forma cuando los ácidos grasos polinsaturados (LH) o lípidos (como los presentes en la membrana celular), al ser afectados por las ERO sobre los radicales lipídicos (L[•]) se transforman por efecto de la oxidación a radicales peroxilo (LOO[•]), formando dienos conjugados hidropéroxido tiene una vida media muy corta, pues reacciona rápidamente con grupos amino libres procedentes de los fosfolípidos, aminoácidos y proteínas presentes en el suero [21].

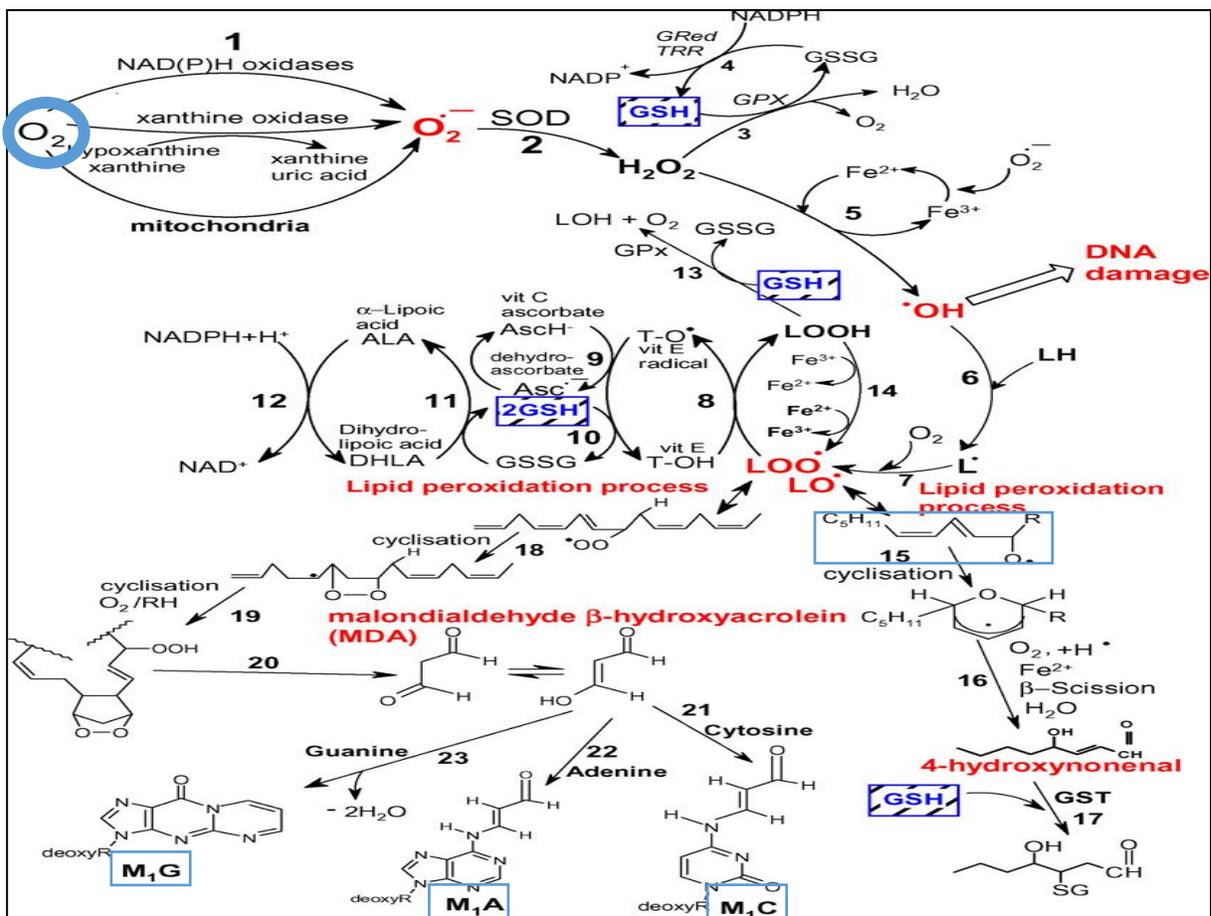


Figura 6. Lipoperoxidación y liberación de productos finales.

2.1.6 Radicales libres y su papel en la oxidación de proteínas

La oxidación es definida como la modificación covalente de los enlaces de las proteínas, todos los aminoácidos pueden servir como blanco del ataque por las especies reactivas, aunque algunos aminoácidos como la metionina, el triptófano, la fenilalanina, la tirosina, la cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina y la histidina son más susceptibles. La modificación de las cadenas laterales de éstos puede generar alteraciones directamente en la estructura, la función de las proteínas, fragmentación química y al incremento en la susceptibilidad a proteólisis.

Se ha demostrado la participación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en la hidroxilación de algunos residuos de tirosina y fenilalanina, formando derivados reducidos como es el caso del 4-dihidroxifenilalanina. La formación de ditirosinas es resultado del ataque de los radicales hidroxilos a las tirosinas, y la nitración de éstas es resultado del daño por especies reactivas de nitrógeno. Sin embargo, la cuantificación de los grupos carbonilos ha sido el biomarcador más utilizado para detectar daño a proteínas, debido a que la exposición de estos grupos es dada por la ruptura de enlaces covalentes y no covalentes entre los diferentes aminoácidos que forman la proteína. Las proteínas dañadas por estrés oxidante no deben ser consideradas como productos finales, ya que éstas son capaces de dañar otras biomoléculas. Las proteínas también resultan sensibles al ataque por parte de los intermediarios o productos finales producidos por el daño de los radicales libres sobre los lípidos, como es el caso del 4-hidroxinonenal. La histidina, la lisina y la cisteína resultan particularmente sensibles a este tipo de ataque [22].

2.2 Métodos de análisis de productos finales del estrés oxidante

A pesar de que se han propuesto varios marcadores para evaluar el estrés oxidante, aún existe un amplio campo de investigación para mejorar y evaluar diferentes métodos. Actualmente existen diferentes técnicas para determinar estrés oxidativo en células y tejidos. Una de las más utilizadas es la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA) [23] (Tabla 2).

Tabla 3 . Técnicas utilizadas para determinar estrés oxidativo.		
Técnica	Elementos detectados	Área de aplicación
Resonancia por captación de electrones (ESR) Resonancia de spin de electrones (EPR)	Superóxidos $\text{O}_2^{\cdot-}$ Radicales hidroxilo $\text{HO}\cdot$ Monóxido de Nitrógeno $\text{NO}\cdot$	Biofísica molecular
Cromatografía de líquidos (HPLC)	MDA	Bioquímica
(ELISA)	MDA	Bioquímica
Espectroscopia de masa (MS)	Superóxidos $\text{O}_2^{\cdot-}$ Radicales hidroxilo $\text{HO}\cdot$ Monóxido de Nitrógeno $\text{NO}\cdot$	Biofísica molecular
Reacción del Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en fluidos y células	Lipoperoxidación (MDA)	Bioquímica
Inmunoquímica de fluidos y tejidos.	3-Nitrotirosina	Inmunoquímica
Inmunohistoquímica de células y tejidos.	3-Nitrotirosina	Inmunohistoquímica

2.2.1 Técnica de separación de moléculas: electroforesis

La electroforesis es un método analítico-semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE). El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) [24].

2.2.1.1 Fundamentos de la electroforesis

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (M_e) es un caso particular de la velocidad de migración de un ion, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm, es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la polaridad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga

eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas, el punto isoelectrico de la biomolécula, es decir el pH tiene una carga neta de 0, esta no migra, por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo [25].

2.2.1.2 Formación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y del monómero (N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$). La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N,N,N,N-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, etc.

Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados [24,25].

2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra, siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. En cromatografía de líquidos, los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil, los componentes se separan debido a la diferencia de migración entre la fase estacionaria y la fase móvil [26].

2.2.2.1 Clasificación de los métodos cromatógrafos

Son clasificados según el estado físico de la fase, el mecanismo de separación y el tipo de soporte. La fase móvil puede ser un gas o un líquido, y la estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Se pueden establecer cuatro tipos de cromatografía: gas-líquido, líquido-líquido, gas-sólido, líquido-sólido. Los mecanismos por los que los diferentes componentes son separados en los procesos cromatográficos son variados, en algunos casos participan más de un mecanismo en un mismo proceso de separación por lo que dificulta la clasificación. Los principales mecanismos que intervienen en la separación cromatográfica son: Adsorción: Gases o líquidos contenidos en la fase móvil son retenidos por una adsorción selectiva en la superficie del sólido que constituye la fase estacionaria. En la interface sólido-fase móvil hay un aumento de concentración respecto a la inicial. Este mecanismo controla la cromatografía gas-sólido y líquido-sólido. Reparto: Los componentes de la fase móvil son retenidos por la fase estacionaria líquida en función de su solubilidad en ella. Si las dos son líquidas se tiene un proceso de extracción en continuo. Intercambio Iónico: La fase estacionaria constituida por un sólido intercambiando iones con iones contenidos en la fase móvil, líquida. El intercambio de iones sólido-solución está regulado por la afinidad química de los iones con ambas fases y por sus respectivas concentraciones.

2.2.2.2 Fundamento de cromatografía

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla, consiste en una fase estacionaria (columna) y una fase móvil, la muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna, estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra.

El HPLC separa componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica, básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector. El analito se pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para analito y depende de la naturaleza del analito, la fase estacionaria y la composición de la fase móvil. Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos entre los cuales está el metanol y acetonitrilo, también suelen usarse sales y bufferes para contribuir a la separación de componentes. También se usa el Ácido Trifluoroacético para actuar como formador de pares iónicos. Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución. Consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad del analito por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector.

Esta técnica está indicada para la separación de compuestos orgánicos semivolátiles como:

- Hidrocarburos Poliaromáticos (PAHs), Aminoácidos: OTA, Ácido Fólico, Herbicidas, Vitaminas, Acido tenuazonico, Formaldehído...etc.
- Rango de trabajo para muestras líquidas: $\mu\text{g/L}$
- Rango de trabajo para muestras sólidas: $\mu\text{g/Kg}$

2.3 Modelo biológico de estudio: el eritrocito

Debido a que los eritrocitos son células que presentan ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática, transportan oxígeno, contienen elevada concentración de hierro (Fe) y hemoglobina, son muy sensibles al estrés oxidante por lo que pueden sufrir lipoperoxidación y degradación de proteínas [27]. Estos procesos pueden llevar a un gran número de cambios, lo que tiende a provocar un descenso de la fluidez de la membrana, alteraciones reológicas y polimerización de proteínas y del citoesqueleto. Considerando que este trabajo de investigación está enfocado a la acción del extracto de tejocote (*Crataegus mexicana*) y manzana californiana (*Malus domestica*) sobre el eritrocito, es importante conocer los aspectos morfológicos y fisiológicos de ésta célula, y entender su metabolismo ya que este puede ser alterado por el estrés oxidativo en la capacidad de los mecanismos antioxidantes del mismo y de los metabolitos antioxidantes presentes en los frutos.

2.3.1 Mecanismo de formación de los eritrocitos

La eritropoyesis es el proceso de formación y maduración de los eritrocitos y dura, aproximadamente, una semana. A partir de las unidades de células progenitoras formadoras de colonias eritrocíticas (UFC-E) se forma la primera célula precursora de la serie roja: el proeritroblasto, el cual se divide y forman distintos tipos de eritroblastos que van madurando y sintetizando hemoglobina (Hb). Una vez se ha llenado el citoplasma de estas células con hemoglobina, el núcleo se condensa y es expulsado de la célula, dando lugar al reticulocito (forma joven de hematíe), que pasa al interior de los capilares sanguíneos para circular por la sangre (figura 4). En el plazo de 1 a 2 días, cada reticulocito se transforma en un hematíe. A causa de su vida breve, la concentración de los reticulocitos, en condiciones normales, es un poco menor del 1% de todos los hematíes circulantes [28].

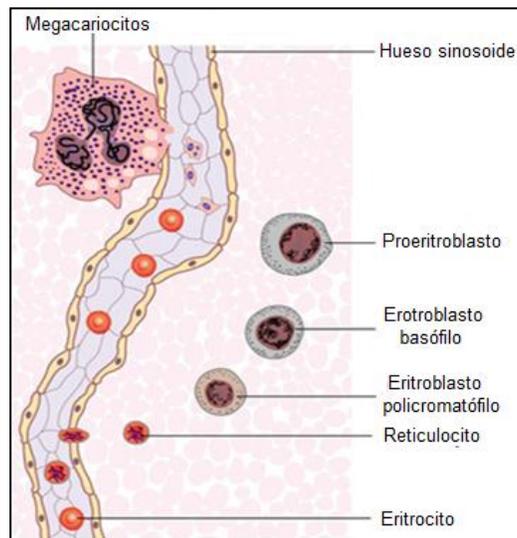


Figura 7. Proceso de maduración del eritrocito en la médula ósea

Durante la transición de reticulocito a hematíe se pierden las mitocondrias y los ribosomas con lo que desaparece la capacidad de realizar el metabolismo oxidativo, de modo que los hematíes maduros cubren sus necesidades metabólicas a partir de la glucosa y la vía glucolítica, produciendo grandes cantidades de 2,3-difosfoglicerato. Existen dos factores reguladores de la producción de hematíes, que son la eritropoyetina y la oxigenación tisular para mantener regulada, dentro de límites muy estrechos, la masa total de eritrocitos en el sistema circulatorio. Siempre hay un número adecuado de eritrocitos disponibles para proporcionar el suficiente oxígeno (O_2) a los tejidos, sin que sea excesivo para dificultar la circulación de la sangre [28].

2.3.2 Morfología del eritrocito

Su forma es la de un disco bicóncavo de un diámetro de 7-8 μm y un grosor máximo de 2 μm . La forma del eritrocito es influida por fuerzas osmóticas, su principal función es el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en la sangre. En la sangre circulan aproximadamente 5 millones de células rojas por milímetro cúbico (5 millones/1 mL) siendo mayor la cantidad en hombres que en mujeres [27]. Su citoesqueleto está constituido por proteínas fibrosas y

globulares, lo que le confiere características biológicas relacionadas a su estructura y función como su capacidad de deformación, flexibilidad, durabilidad, todo ello les permite circular por los capilares sanguíneos, deformándose por fuerzas físicas y volviendo a su forma original discoide. Alteraciones en las proteínas de membrana están asociadas a muchos padecimientos como la esferocitosis hereditaria, la eliptocitosis hereditaria, la estomatocitosis hereditaria y la hemoglobinuria paroxística nocturna. Los índices de células rojas son utilizados para detectar anomalías en el tamaño, forma y color del eritrocito, y existen muchas enfermedades que afectan los eritrocitos [28].

2.3.3 Mecanismo de oxidación del eritrocito

El eritrocito es una célula con una alta especialización bioquímica, como es el transporte de oxígeno a los tejidos [28]. El eritrocito debe pasar por varias etapas durante la eritropoyesis, por lo que presentan cambios en su desarrollo fisiológico, que pueden ser afectados por diversos factores, incluyendo su almacenamiento en paquetes sanguíneos. La destrucción de los eritrocitos por eritropoyesis dentro de los vasos sanguíneos puede provocar alteraciones de las condiciones fisiológicas de la sangre, alteraciones en la coagulación, daño a la microcirculación y daños renales entre otros; la eritropoyesis también puede iniciarse por infecciones, enfermedades metabólicas, deficiencias de glucosa 6-fosfato deshidrogenada, intoxicación por metales, y el propio envejecimiento celular [27]. El envejecimiento del eritrocito se caracteriza por un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre, debido a un incremento en las permeabilidades al calcio que pueden iniciarse por choque osmótico, estrés mecánico, depleción de energía o incremento de los procesos oxidativos que sobrepasen los sistemas de protección antioxidante. Todos estos mecanismos en el proceso de eritropoyesis está asociado a la formación de radicales libres de O_2 y que a su vez forman ERO que dañan la membrana del eritrocito y por lo tanto aceleran la muerte celular.

Para protegerse contra el daño producido por la presencia de radicales libres de O_2 que reaccionan con la hemoglobina o cualquier otra *metalo*-proteína, el eritrocito presenta un activo sistema de defensa antioxidante. Además de las diversas moléculas con capacidad antioxidante como son las vitaminas C y E, el ácido úrico, bilirrubina y glutatión reducido,

entre otras diversas proteínas circulantes como son la albúmina y las enzimas antioxidantes, en la sangre se presenta un importante mecanismo antioxidante regulado por la enzima superóxido dismutasa SOD y la enzima catalasa [27].

2.4 Antioxidantes

En un sistema biológico, un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que, en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable significativamente, puede retrasar o prevenir la oxidación del sustrato, el sustrato oxidable puede ser cualquier molécula que se encuentra en alimentos o materiales biológicos, incluyendo ADN, lípidos y proteínas, el propósito principal de usar un antioxidante como un aditivo para alimentos es mantener la calidad de dicho alimento y extender su vida útil [39,40].

Los antioxidantes son un conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales libres u oxidantes, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando las funciones celulares, se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres, el sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen logrando retrasar la producción y acción de los radicales libres, algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son el glutatión, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los bioflavonoides, la vitamina E (α - tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetil-L- carnitina, coenzima Q₁₀, curcumina, N-acetil- cisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes [39]. Las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio y flavonoides son las moléculas químicas antioxidantes más conocidas, el sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas

incluye a enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peróxidasa (GSH-PX), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa [41].

2.4.1. Clasificación de los antioxidantes

Si bien existen diferentes formas de clasificar a los antioxidantes, destacan los biosintetizados y los que se obtienen a través de la dieta.

1. *Antioxidantes exógenos*: Vitamina E, vitamina C, β -carotenos, vitamina A, Selenio y Zinc los cuales deben ser aportados en nuestra alimentación diaria, actúan en las fronteras celulares, encerrando los radicales libres antes de que produzcan daños.
2. *Antioxidantes endógenos o enzimáticos*:
 - Superóxido dismutasa: Destruye y bloquea producción de radicales a partir del oxígeno.
 - Glutatión peroxidasa: Bloquea producción y destruye radicales procedentes de las grasas.
 - Catalasa: Regula la producción de peróxido de hidrógeno

En la naturaleza, las plantas y animales que sirven de alimentos al ser humano contienen altos niveles de antioxidantes. En años recientes se ha dado mayor importancia al consumo de frutas y vegetales por su contenido en antioxidantes [51].

2.4.1 Efectos de los antioxidantes en el organismo

Estudios epidemiológicos demuestran que una dieta rica en frutas y verduras genera menor riesgo de desarrollar cáncer, enfermedades cardiovasculares y crónicas como cataratas, asma y bronquitis. Esto es por la presencia de antioxidantes como las vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, selenio, etc., que interfieren con el daño oxidativo al ADN, proteínas y lípidos. El licopeno es un caroteno encontrado en el jitomate que disminuye los niveles de

malondialdehído y por lo tanto la lipoperoxidación [52]. Los extractos de manzana con alto contenido de polifenoles flavonoides, inhiben la lipoperoxidación en plasma humano [53]. El té verde contiene alto contenido de flavonoides (catequinas) y actúa como antioxidante en la membrana del eritrocito evitando la oxidación de la hemoglobina [54].

2.5 Descripción del fruto: tejocote (*Crataegus mexicana*)

En México, existe una extensa variedad de plantas, muchas de ellas con una amplia diversidad genética, siendo útiles para la agricultura, la industria, la medicina y con potencial alimenticio de diversa índole que no han sido correctamente exploradas ni explotadas [55]. Conocer las propiedades y el contenido nutrimental de las frutas, es uno de los primeros pasos para su uso en diversas condiciones nutricionales. Dentro de esta gran diversidad de frutas se encuentra el tejocote.

El nombre de tejocote deriva del Náhuatl “tetl (piedra) – xócotl (fruto)”, que significa fruta dura y ácida o agria; similar al nombre que le dieron al manzano este mismo grupo étnico, llamándolo texococuahutl. El nombre científico de la variedad que nos interesa en este trabajo es *Crataegus mexicana*.

Se produce del árbol de tejocote que mide de 5 a 10 m, sus hojas son ovales o en forma de diamantes, de 4 a 8 cm de largo y con márgenes serrado. Es un fruto pequeño, globoso y de forma oblonga. Fruto común de temporada, pero en algunas regiones del país se le encuentra todo el año, cuando madura sus tonalidades varían de un amarillo anaranjado al amarillo rojizo, es aromático y de buen sabor.

Los españoles al llegar al “nuevo continente” lo nombraron “manzanita” por la semejanza de sus frutos a las manzanas, nombre que subsiste en Chiapas y Oaxaca a la cual también se le denomina manzanilla y tejocote zimarrón. En el estado de México npeni en lengua otomí. En Michoacán como karhasi en lengua purépecha, en inglés se denomina Hawthorn o mexican wild crabapples [56].

2.5.1. Origen

El género *Crataegus* se originó en la Era Terciaria, y al parecer, se desarrollaron dos líneas paralelas de evolución; una en Asia y la otra en el Norte de América. Sin duda las especies de *Crataegus* en Europa son derivadas del centro y de China. La especie de *Crataegus* que predomina en México es *C. mexicana*, y aunque se tienen dudas del origen del tejocote, se cree que se originaron de *C. scabrifolia* que tiene su hábitat en el Este del Continente Asiático; sin embargo, no se descarta a México como posible centro de origen.

Es una fruta que se considera típica de México desde épocas prehispánicas, aunque se le encuentra en muchos países del mundo, como Asia y China. En México se han reportado 13 especies en el centro y norte y 2 más en el sur, de las cuales 9 o 10 son endémicas, siendo las más comúnmente utilizadas para su consumo e industrialización *Crataegus mexicana* y *Crataegus gracilior*. Especies de este género han sido reportadas en 20 de los 32 estados de la República Mexicana en altitudes que van de los 400 hasta los 3,000 m. de altura, en climas húmedos, semi-secos y secos. Se distribuye principalmente en el Estado de México, Puebla, Tlaxcala, Chiapas, Michoacán, Hidalgo y Morelos. En la parte norte del país sobre todo Coahuila y Nuevo León, es también comestible el tejocote rojo (*Crataegus greggiana*). Está distribuido en la mayor parte de las zonas montañosas de México, sobre todo en el eje neovolcánico (desde el estado de Veracruz hasta el estado de Jalisco), la Sierra Madre Oriental (entre los estados de Hidalgo, Tamaulipas, San Luis Potosí, Coahuila y Nuevo León), la Sierra Madre del Sur (Sierra de Oaxaca y Guerrero) y los altos de Chiapas. El Estado de México y Tlaxcala son los principales productores de Tejocote en México. De estos, se clasifican en tipos criollos y cultivados, los primeros se localizan entre los 14 y 32° de latitud norte, y los cultivados entre los 19 y 20° de latitud norte [56].

2.5.2. Clasificación taxonómica

Del año 372-287 a. de C., en Grecia, el filósofo Theophrastus dio la primera descripción del género, dándole el nombre de *Krataigos* (fuerte, resistente). El género *Crataegus*, está

constituido aproximadamente por 140 especies dispersas por todo el mundo, de las cuales 95 de ellas se encuentran en el Continente Americano, dividido en 40 series, de las cuales dos terceras partes se encuentran en Norteamérica y el resto en Europa y Asia.

La taxonomía de este género se reporta como una de las más complejas entre las plantas superiores a nivel mundial, lo cual ha provocado serios problemas de identificación y homonimias. En México, el nombre más común para el género *Crataegus* es el “Tejocote”, en especial para *Crataegus mexicana*. [42].

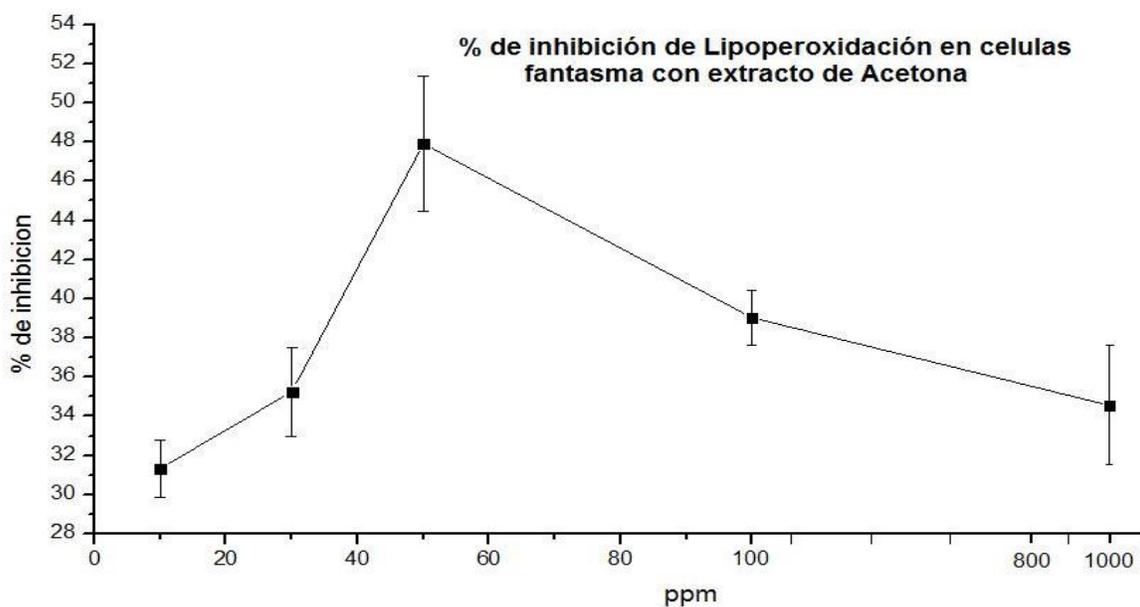
2.5.3 Antecedentes como antioxidante del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*)

En el grupo de investigación de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala en el año 2011 realizo un estudio de la epidermis de tejocote como fuente de antioxidantes que nos demuestra que la cantidad de antioxidantes presentes en la epidermis es relativamente alta, midieron el contenido de carotenos totales siendo este de $26.4 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$, en cuanto al contenido de polifenoles se reportó $1.13 \pm 0.23 \text{ mg}$ equivalente al ácido gálico/g, comparándolo con otros frutos como algunos tipos de manzana, la cantidad de estos antioxidantes es alta, también evaluaron la actividad antioxidante, por medio de los siguientes métodos ABTS, DPPH y TBARS. Posteriormente en el 2013 se evaluó por los mismos métodos calculando IC_{50} , reportando los siguientes valores: el extracto de acetona fue el más activo, con un valor de IC_{50} de 15.2 mg / L , para DPPH y TBARS de 17.7 mg / L , se observó una alta correlación entre los resultados de TBARS y DPPH [6].

En un estudio adicional se probó el mismo extracto pero utilizado como fuente de lípidos a los eritrocitos, se pretendía demostrar la actividad antioxidante en este modelo de estudio. Se realizaron diferentes pruebas y se concluyó lo siguiente:

El comportamiento esperado del extracto era que al aumentar la concentración aumentaría la inhibición de la lipoperoxidación, los resultados fueron congruentes hasta la concentración del extracto a 50 ppm con un porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación de células fantasma de eritrocitos humanos (eritrocitos sin hemoglobina) de 47.91% y después el porcentaje de

inhibición cae de manera significativa a una concentración de 100 ppm y aún más a 1000 ppm hasta 34.56%, como se observa en la siguiente grafica [43], la cuantificación de MDA se realizó por técnicas espectrofotométricas; en el cual se hizo reaccionar con el ácido tiobarbitúrico para obtener un cromoforo (MDA-TBA) y cuantificar el porcentaje de lipoperoxidación. Sin embargo con los resultados obtenidos se decidió comprobar mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se existe alguna interferencia del cromóforo formado con la hemoglobina; así como la efectividad del extracto para inhibir la lipoperoxidación en eritrocitos.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2012-3013.

2.6 Descripción del fruto: manzana californiana (*Malus domestica*)

El manzano (*Malus domestica*) es un árbol de la familia de las rosáceas, cultivado por su fruto que es un apreciado alimento. En la actualidad existen unas 1.000 especies de diferentes tamaños, colores y sabores, como resultado de diferentes hibridaciones entre especies

silvestres. Es un árbol de mediano tamaño (12 m de altura), caducifolio, de copa redondeada, abierta y numerosas ramas que se disponen casi en horizontal. Posee hojas ovaladas, suavemente dentadas en los bordes y de fuerte color azul con pubescencia en el envés. Al estrujarlas despiden un agradable aroma. Las llamativas flores (también aromáticas) tienen una corona 5 pétalos blancos, redondeados, frecuentemente veteados de rojo o rosa. Surgen agrupadas en racimos de entre tres y seis unidades de las ramas jóvenes laterales formando corimbos, siendo la central la primera en formarse en posición terminal, resultando la más desarrollada y competitiva. A ésta se le llama comúnmente flor reina y generalmente produce los frutos de mayor tamaño y calidad. Las flores son hermafroditas, con un cáliz de cinco sépalos y numerosos estambres amarillos.

El fruto que se desarrolla a partir de este pedúnculo floral que se vuelve carnoso es la manzana. De piel verde amarilla o roja, es suave y brillante. Su pulpa es jugosa y dulce y contienen semillas. La manzana del manzano silvestre se diferencia por un color verde amarillento en su piel y de sabor agrio [58].

El nombre científico *Malus*, viene de la palabra latina que significa fruto, y ésta del malon del griego arcaico (que también derivó en melón más adelante). *Domestica* hace referencia a que es una especie domesticada. En castellano "Manzana", se decía antiguamente "manzana" y esta forma se deriva del romance "mattiana". Antiguamente a la "Manzana" se le llamaba mala (fruta) mattiana. Mattiana es el nombre latino de las manzanas, así llamadas en memoria de Caius Matius, tratadista de agricultura que vivió en el siglo I antes de Cristo. El nombre aparece documentada bajo manzana (1112) y desde Juan Ruiz bajo mançana (1335), forma que se halla también en el Cid. El nombre en francés "Pomme", deriva de que en el siglo III se empezó a utilizar el eufemismo pomum para designar a la manzana, que en principio solo significaba fruto. "Apple", manzana en inglés, viene de la palabra aeppel del inglés antiguo, y la teoría predominante es que la "apple" puede ser una de las palabras más antiguas indoeuropeas (ABL) que conservan una forma reconocible en inglés. El legendario nombre del lugar Avalon (isla-manzana) también se cree que proviene de una evolución celta de la misma raíz, al igual que el nombre de la ciudad de Avellino, cerca de Nápoles, en Italia [59].

2.6.1 Origen

Encontrado típicamente en una altitud de 0 a 2.500 metros sobre el nivel del mar (0 a 8.202 pies). Los manzanos silvestres se pueden encontrar a lo largo de los bordes del bosque, en los campos en desuso o abandonados, y en zonas arbustivas y claros de las mismas. Debido a que crecen mejor a pleno sol, se las frutas crecen menos y pierden su vitalidad cuando otros árboles crecen a su alrededor, debido a demasiada sombra y a que la raíz se siente hacinada. Los árboles tienden a generar más ramas que lo que el espacio permite y la disponibilidad de luz solar. Debido a esto, los manzanos que crecen en estado silvestre a menudo producen menos fruta [60].

Domesticado hace más de 15.000 años, su origen parece ser el Cáucaso y las orillas del Mar Caspio. Fue traído a Europa por los romanos y en la actualidad existen unas 1.000 especies, como resultado de diferentes hibridaciones entre especies silvestres. Uno de sus antepasados silvestres es *Malus sieversii*, árbol que todavía existe en las montañas de Asia central, en el sur de Kazajistán, Kirguistán, Tayikistán y Xinjiang (provincia de China). Los investigadores están trabajando con esta especie, ya que es resistente a muchas enfermedades y pestes, para crear manzanos domésticos más vigorosos. A principios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer habla de las hierbas de las manzanas o camuesas para las cuartanas (calentura, casi siempre de origen palúdico, que se manifiesta con frío de cuatro en cuatro días). Para el siglo XX, Maximino Martínez la reporta como antidiabético. Luis Cabrera cita los usos siguientes: antidiarreico, antipodágrico, eficaz contra la dispepsia, emético, produce náusea y para la uremia [61].

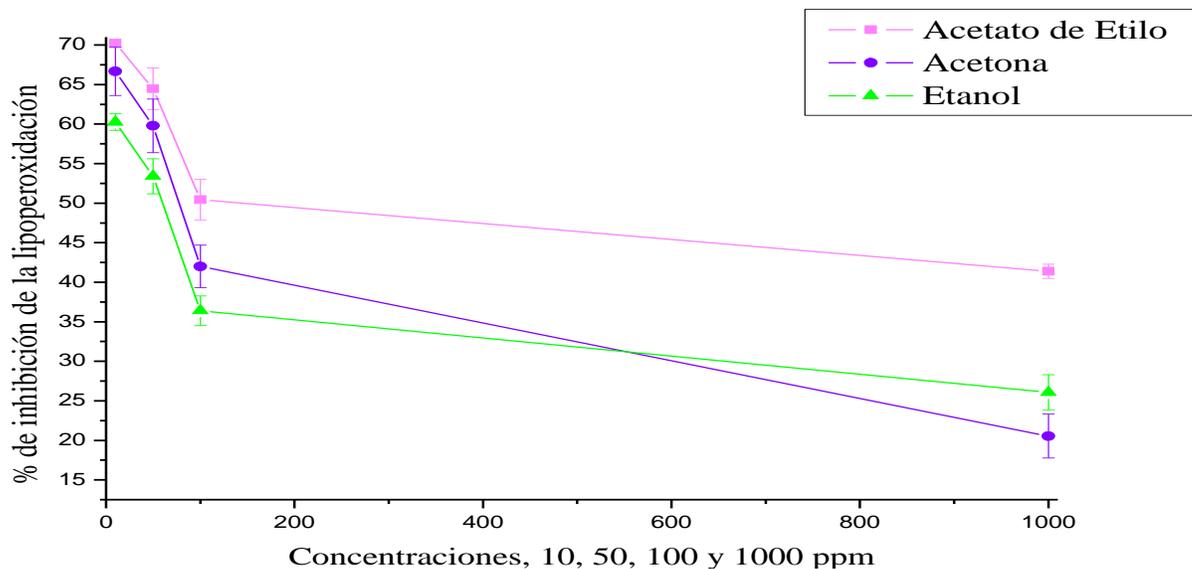
2.6.2 Antecedentes de manzana (*Malus domestica*) como antioxidante

En el laboratorio se ha trabajado inicialmente con pruebas a 10, 100 y 1000 ppm de concentración en extractos de manzana californiana y tejocote, los cuales resultaron muy activos como antioxidantes en tejido de cerebro de rata y conejo para la inhibición de la

lipoperoxidación inducidos con FeSO_4 *in vitro*, con la finalidad de identificar la cantidad mínima de extracto que se necesita para inhibir al 50% la formación de TBARS, los extractos que de acuerdo a estas concentraciones resultaron con mayor actividad fueron los de acetato de etilo, acetona, etanol, realizándole IC_{50} , el más activo fue el extracto de acetato de etilo con 35.99 ± 0.65 ppm que es 10 veces menor que la quercetina, seguido del extracto de acetona con 41.74 ± 0.59 ppm y de 259.29 ± 0.91 ppm para el extracto etanólico [44].

Una prueba adicional con el extracto de manzana fue el de probar su actividad antioxidante utilizando como fuente de lípidos el plasma sanguíneo, de igual manera se esperaba aunque al aumentar la concentración aumentara la inhibición de la lipoperoxidación, sin embargo se obtuvieron los siguientes resultados; cuando se manejan concentraciones mayores a 50 ppm la activada antioxidante se ve inhibida como se muestra en la siguiente gráfica. Se espera obtener una respuesta clara al cuantificar de manera directa el MDA mediante HPLC.

Tbars de extractos de epidermis de manzana (Muestra 1)



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2012-3013.

2.7. Extracción de metabolitos

Existen varios tipos de aparatos con los cuales se puede llevar a cabo la extracción con solventes. Uno de los más utilizados es el extractor *Soxhlet*. Sin embargo, la muestra (frutos o vegetales) puede ser simplemente macerado con un solvente orgánico; los más usados son éter de petróleo, etanol, pentano, hexano, tolueno, benceno, *iso*-propanol, acetona, acetato de etilo, acetato de metilo o éter dietílico. Este método requiere de la concentración posterior de la muestra, seguido de la evaporación del solvente. Esta es, por supuesto, una parte delicada de la operación y deben tomarse precauciones para evitar pérdidas por evaporación de los demás compuestos volátiles.

Se debe tener en cuenta que la extracción de sólidos naturales es un proceso de transferencia de masa relacionado con el transporte del disolvente en la disolución de los solutos matriz (transporte interior), solubilidad y la liberación de solutos a partir de una matriz sólida. Tienen como objetivo reducir la limitación de transferencia de masa y aumentar el rendimiento de la extracción. Los disolventes habituales son metanol y acetona, Ya que proporcionan un alto rendimiento antioxidante debido a su capacidad de unión a hidrógeno, que es crucial para la extracción de diterpenos fenólicos responsables de las propiedades antioxidantes en muchos materiales vegetales, tales como hojas de romero [45].

Los principales factores que contribuyen a la eficiencia de la extracción son: tipo de disolvente, pH, temperatura, número de pasos y el volumen de disolvente, y el tamaño de partícula en la muestra [46].

3. JUSTIFICACIÓN

La relación existente entre la concentración de especies reactivas del oxígeno (ERO) y el estado de salud de los seres humanos es un hecho aceptado por la comunidad científica. En la protección de las células contra la oxidación actúan diferentes niveles de defensa antioxidante en los que participan enzimas, las cuales seden electrones al radical libre para estabilizarlo.

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas [1,2].

Numerosos estudios sugieren que se podría retardar el envejecimiento patológico si se consumieran dietas ricas en antioxidantes, así sería posible proteger más eficazmente al organismo contra el estrés oxidante, que contribuye al envejecimiento normal y tiene un papel aún más importante en la aterosclerosis, inmunodepresión y otros procesos degenerativos que a menudo forman parte del envejecimiento patológico [2,4]. Por otra parte, la capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes presentes en él, y varía de un alimento a otro. Diversos estudios epidemiológicos apoyan la relación entre el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos y una baja incidencia de enfermedad cardíaca coronaria, aterosclerosis, ciertas formas de infarto y cáncer [5].

En este proyecto se utilizó el tejocote (*Crataegus mexicana*) y manzana californiana (*Malus domestica*) ya que son frutos que podemos encontrar en gran parte del centro del país, abundando en el último trimestre del año en la zona centro del país. Asumiendo estos antecedentes se continúa con la búsqueda de alternativas que fortalezcan el sistema de defensa antioxidante y contribuyan con la disminución de enfermedades relacionadas con la producción de radicales libres.

4. HIPÓTESIS

Los extractos de tejocote y manzana presentan actividad antioxidante por lo que inhibirán la lipoperoxidación y el daño a proteínas en eritrocitos, bajo estrés oxidante *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Estudiar el efecto protector de extractos de tejocote (*Crataegus mexicana*) y manzana californiana (*Malus domestica*) en el eritrocito humano, bajo estrés oxidante *in vitro*.

5.2 ESPECIFICOS

Determinar el daño a proteínas en la membrana celular del eritrocito mediante electroforesis.

Cuantificar el porcentaje de inhibición de lipoperoxidación en la membrana celular del eritrocito mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

6. METODOLOGÍA

6.1 Ubicación y espacio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación de Química de la Nutrición de la Licenciatura en Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, ubicada en San Pablo del Monte, Tlaxcala

6.2 Tipo de estudio

Experimental

6.3 Tipo de diseño experimental

Medidas repetidas de un solo factor

6.4 Obtención de extracto de frutas

- ❖ La recolección de tejocote (*Catragus mexicana*) se realizó en el municipio de Terrenate perteneciente al estado de Tlaxcala. En cuanto a la manzana californiana (*Malus domestica*) la recolección se hizo en el municipio de Huejotzingo perteneciente al estado de Puebla, se seleccionaron los frutos que tengan las siguientes características: apariencia del fruto en buen estado, libre de defectos y de tamaño estándar, posteriormente se lavaron y la epidermis se separó de la pulpa para ser liofilizada.
- ❖ La epidermis se liofilizó a -54°C .
- ❖ Se usaron 30 g de epidermis liofilizada, se agregaron 300 mL de disolvente para su extracción durante 48 h a 25°C .
- ❖ Los solventes que se utilizaron para la extracción de metabolitos fueron: hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol. Los solventes se usaron en función a su polaridad y se inició con *n*-hexano, después fue separado el disolvente por medio de un rotavapor resultando así los extractos. De esos 6 extractos se decidió trabajar para ambos frutos con el extracto de acetato de etilo, ambos tiene una

polaridad media y en las pruebas realizadas con anterioridad en el laboratorio han presentado una actividad antioxidante elevada, son reproducibles y altamente estables.

- ❖ Los extractos se obtuvieron a temperatura ambiente, variando el peso obtenido de cada uno.

6.5 Obtención de sangre

Los criterios utilizados para la obtención de sangre venosa por venopuntura es: selección de 9 sujetos de género masculino, el rango de edad es de 20 a 30 años, se realizará un examen clínico para descartar la posibilidad de que presenten algún tipo de enfermedad crónica degenerativa, los participantes a quienes se les informara del propósito del estudio, se les invitará a participar de manera voluntaria y con consentimiento por escrito.

6.6 Manejo y preparación de las muestras de sangre

- Cada muestra de sangre (4 mL) obtenida por venopuntura de la vena radial interna y colocada en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante.
- Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, de esta manera se obtendrá la separación del plasma y los eritrocitos.
- Los eritrocitos fueron separados y lavados posteriormente con PBS (Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio a un pH de 7.4 y 8.0).
- Se formaron 2 grupos uno de eritrocitos control (EC) y otro de eritrocitos experimental (EE).
- Las muestras fueron sometidas a estrés oxidante con el inductor FeSO_4 a una concentración de 100 μM para determinar el grado de lipoperoxidación y daño a proteínas *in Vitro*.

6.7 Consideraciones bioéticas

El presente estudio fue valorado por la comisión de bioética de la Licenciatura en Nutrición de la Facultad de Ciencias de la salud de la Universidad Autónoma de Tlaxcala para asegurar que los participantes corrieran un riesgo mínimo firmando esta comisión una carta de riesgos y un oficio de autorización del proyecto, se envió a la Comisión Estatal para la Protección contra Riesgos Sanitarios del Estado de Tlaxcala (COESPRIST) un permiso de realización de proyecto de investigación y a los participantes se les proporcionaba una carta de consentimiento informado. (Documentación anexada al presente trabajo). La clasificación de riesgo se realizó en base al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, título segundo De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos Capítulo I, artículo 17. La toma de muestras fue realizada por un especialista en medicina y el manejo de los residuos fue colocado en los botes de los insumos necesarios para el envasado de los residuos de unidades de sangre que se generen en el servicio, que de acuerdo a la clasificación de la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, son bolsas rojas y contenedores de punzocortantes.

6.8 Técnicas de análisis de lipoperoxidación y daño a proteínas

6.8.1 Análisis del eritrocito por electroforesis en gel de SDS- PAGE

La técnica de electroforesis es la más utilizada para el análisis de proteínas, sus siglas en inglés son SDS- PAGE (sodium dodecil sulphate – Polyacrylamide gel electrophoresis), que es un tipo de gel que se realiza en presencia de SDS que es un detergente de acción desnaturizante que por acción de calor y β mercaptoetanol, el cual destruye los puentes de sulfuro y los separa en cadenas polipeptídicas aisladas. Este método fue descrito por Laemmli en 1970. Se realizaron pruebas en este tipo de gel SDS- PAGE al 10% para determinar el efecto del antioxidante en las muestras de eritrocitos tanto control como experimental. Posteriormente para la tinción del gel se utilizara azul de Coomassie, se hará la comparación de la presencia y el número de bandas presentes en el gel con y sin agente antioxidante.

6.8.2 Determinación de malondialdehído (MDA) por HPLC

Conociendo la cantidad de eritrocitos y la concentración de proteínas se colocaron 25 μ L de eritrocitos en tubos eppendorf tomándose por triplicado. Los eritrocitos control (EC) fueron sometidos a oxidación con sulfato ferroso, los eritrocitos experimental (EE) fueron expuestos a los extractos de tejocote y manzana california para posteriormente ser oxidados con sulfato ferroso el cual iniciara el proceso de formación de radicales libres a partir de la lipoperoxidación de la membrana del eritrocito. Las concentraciones de malondialdehído fue contabilizadas por medio del HPLC, se preparó previamente una curva estándar MDA (2-10 μ g/mL) con 5 μ L de TMP (1,1,3,3-tetrametotóxipropano) con 5 mL de HCl. Las determinaciones en cromatografía se realizaron en un equipo AGILEN serie 1200, bajo las siguientes condiciones: flujo 2.5 mL/min, longitud de onda 254 nm, presión 90-100 bar, columna de fase inversa C₁₈ (4.6 x 250 mm) marca zorbax, la fase móvil fue 85% ac. acético al 1% y 15% de acetonitrilo, se realizaron inyecciones de 20 μ L, el tiempo de retención fue de 1.44 minutos a temperatura ambiente.

7. RESULTADOS

7.1 Recolección del fruto

La manzana recolectada fue de 8.75 kg y el total de epidermis liofilizada de manzana fue de 324 g.



Figura 8. Epidermis de manzana deshidratada

El tejocote recolectado fue de 7.5 kg y el total de epidermis liofilizada de tejocote fue de 297 g.



Figura 9. Obtención de epidermis de tejocote

7.2 Extractos

Los extractos se obtuvieron a partir de 30 g de epidermis deshidratada y molida; extraído con 300 mL de cada disolvente, después fue separado el disolvente por medio de un rotavapor resultando así los extractos. De esos 6 extractos se decidió trabajar para ambos frutos con el extracto de acetato de etilo ambos tiene una polaridad media debido al solvente con el que se extraen los metabolitos y en las pruebas realizadas con anterioridad en el laboratorio han presentado una actividad antioxidante elevada, son reproducibles y altamente estables. Estos extractos se obtuvieron a temperatura ambiente, variando el peso obtenido de cada uno.



Extracto	Peso (g)
Acetato de Etilo (Manzana)	0.6799 g
Acetato de Etilo (Tejocote)	0.4505 g

Figura 10. Extractos de manzana (acetato de etilo) y tejocote (acetato de etilo).

7.3 Obtención de los eritrocitos

Para la obtención de eritrocitos se tomó una muestra de 4 mL en un tubo vacutainer con EDTA, posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma de los eritrocitos. Al término del proceso de centrifugado se retira el plasma y los leucocitos, se agrega a los eritrocitos restantes la misma cantidad de PBS y se centrifuga durante 10 minutos, el proceso de lavado de los eritrocitos se repite 3 veces.

7.4 Determinación de inhibición de daño a proteínas en geles SDS- PAGE

1. Para la realización de esta prueba se utilizaron diferentes disoluciones de ambos extractos. Se pesó 7.1 mg del extracto en un vial, se agregan 5 mL de PBS (pH 7.4), al diluir esta solución tenemos una concentración de 1400 ppm, se aplican ondas ultrasónicas para unificar el extracto. Posteriormente se realizaron las siguientes disoluciones:
 - A. 5 ppm: 1494.7 μ L de PBS + 5.3 μ L de la solución de 1400 ppm
 - B. 10 ppm: 1489.4 μ L de PBS + 10.6 μ L de la solución de 1400 ppm
 - C. 50 ppm: 1447.1 μ L de PBS + 52.9 μ L de la solución de 1400 ppm
 - D. 100 ppm: 1394.37 μ L de PBS + 105.63 μ L de la solución de 1400 ppm

- E. 500 ppm: 971.84 μL de PBS + 528.16 μL de la solución de 1400 ppm
- F. 1000 ppm: 443.6 μL de PBS + 1056.33 μL de la solución de 1400 ppm

Para la preparación del oxidante se realizó lo siguiente: se pesó 6.9 mg de FeSO_4 , este compuesto genera radicales libres de oxígeno, se aforo en un matraz volumétrico de 25 mL. Posteriormente se tomó 1 mL de la solución y se agregaron 9 mL de agua, la concentración final de trabajo fue de 100 μM .

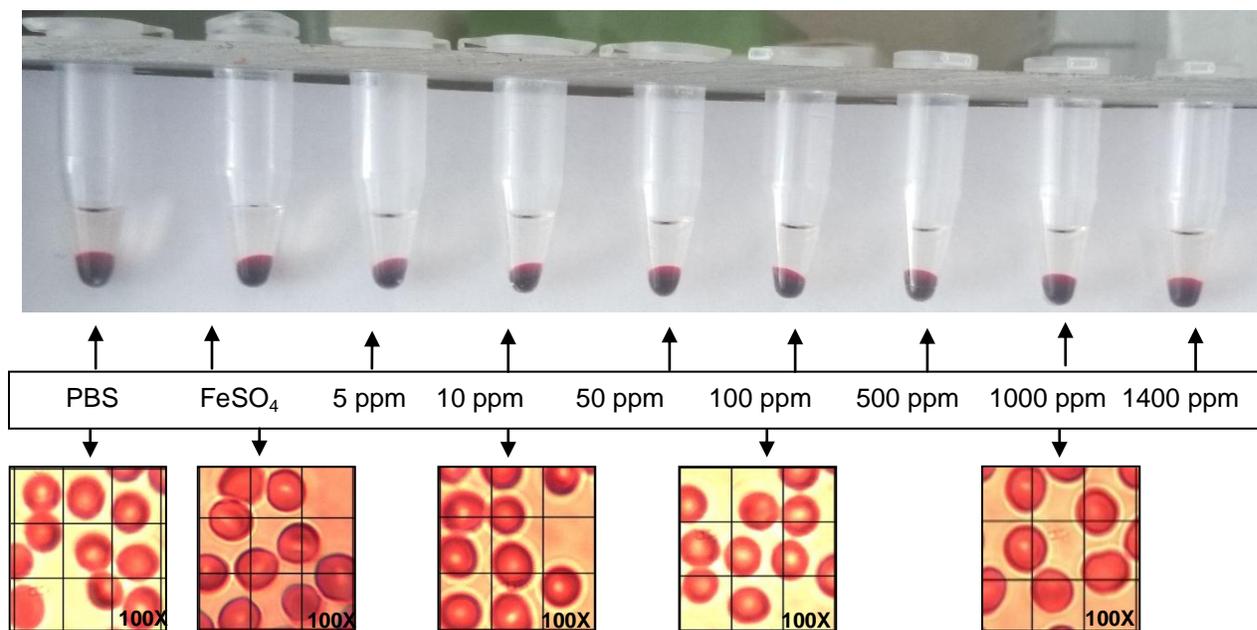
Posteriormente se utilizaron 10 tubos eppendorf, se trabajaron diferentes concentraciones del extracto y se utilizó un grupo blanco y un grupo control. Se utilizaron 25 μL de eritrocitos en cada uno de los tubos, el estrés oxidante fue inducido mediante FeSO_4 . las diluciones iniciales de trabajo fueron 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1400 ppm. Los tubos se llenan por triplicado y están conformados de la siguiente manera:

- A. PBS (grupo blanco), se agregaron 200 μL de PBS y 25 μL de eritrocitos.
- B. FeSO_4 (grupo control), se agregaron 175 μL de PBS, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos.
- C. 5 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 5 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos.
- D. 10 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 10 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos.
- E. 50 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 50 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos
- F. 100 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 100 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos.
- G. 500 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 500 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos
- H. 1000 ppm (extracto de manzana), se agregaron 175 μL de extracto diluido a 1000 ppm, 25 μL de FeSO_4 y 25 μL de eritrocitos.

Se inició realizando esta prueba con el fin de observar de forma macro y microscópicamente el proceso de hemólisis que sufren los eritrocitos en un tiempo de 28 días. Los días que se utilizaron para observar este proceso fueron: 0, 7, 14,21, 28 días.

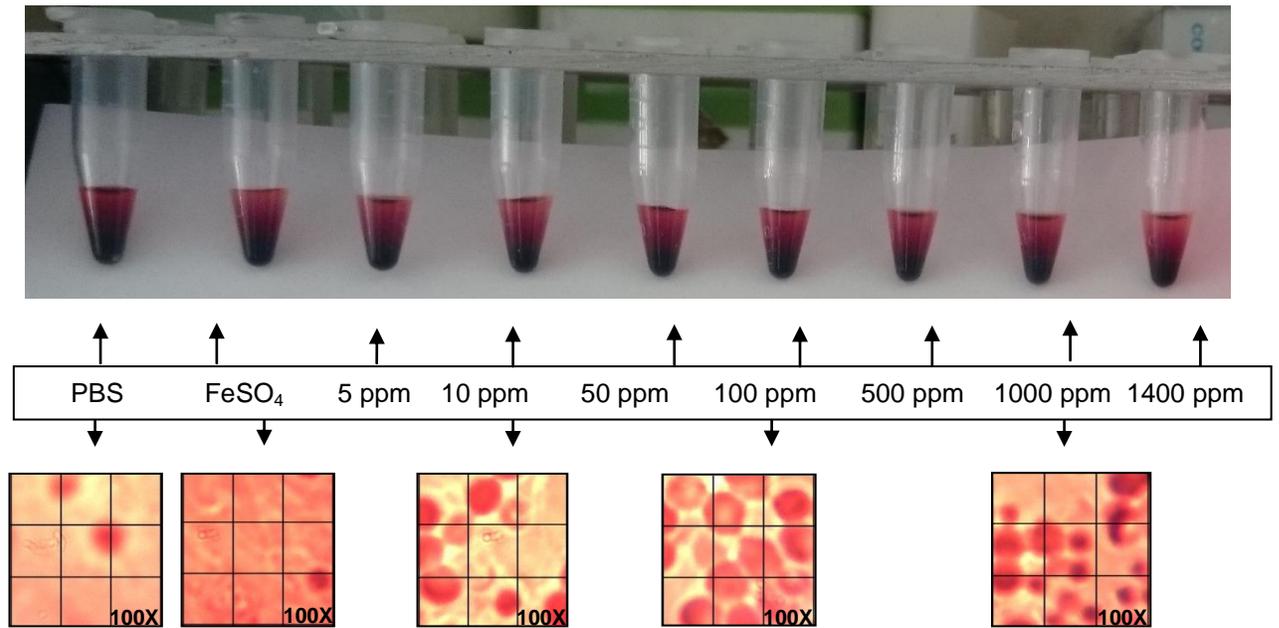
La prueba que se realizó en los tubos eppendorf se utilizaron para observar la hemólisis, también se tomaron fotos de los extendidos citológicos por medio de microscopia de luz. En los extendidos citológicos se tomaron de cada tubo 5 μ L de eritrocitos y se colocaron en un porta objetos, posteriormente se tiñeron con el método hematoxilina-eosina. Cada muestra previamente teñida se observaron al microscopio utilizando el objetivo 100x, de cada muestra se seleccionaron tres campos diferentes, posteriormente de cada campo se seleccionaba 9 campos y se tomaron las fotos correspondientes. En las imágenes siguientes se observan los resultados de ambas pruebas, en cuanto a las fotografías de los extendidos citológicos solo se reportaron las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, así como, el grupo blanco y control.

Figura 11. Tubos eppendorf con extracto de manzana (acetato de etilo), día 0.



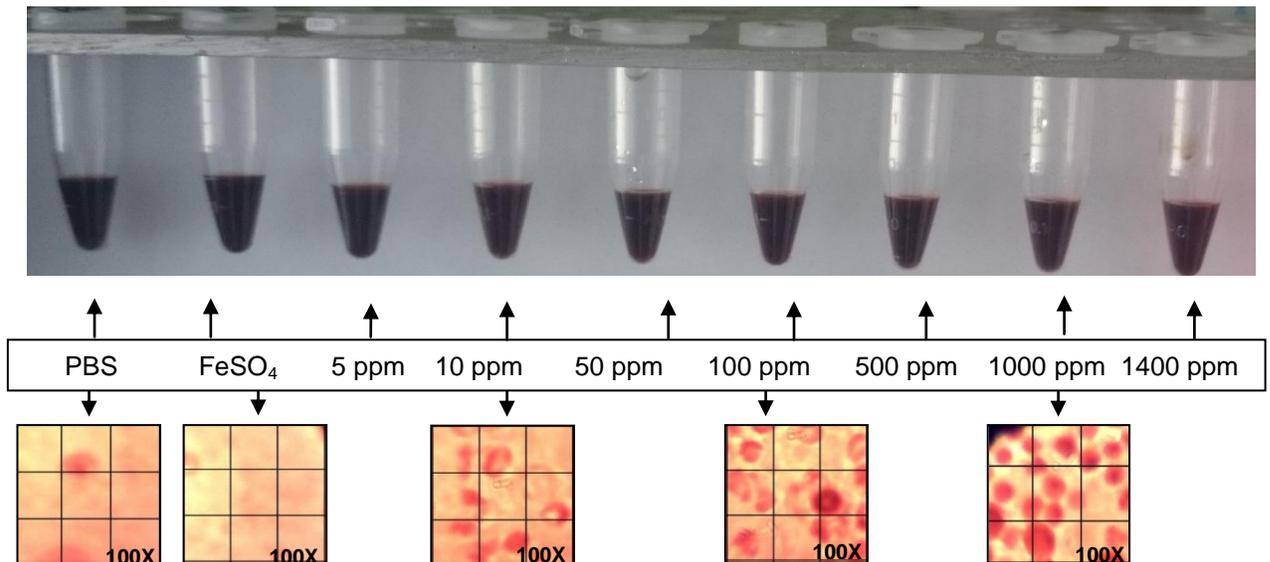
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 12. Tubos eppendorf con extracto de manzana (acetato de etilo), día 7.



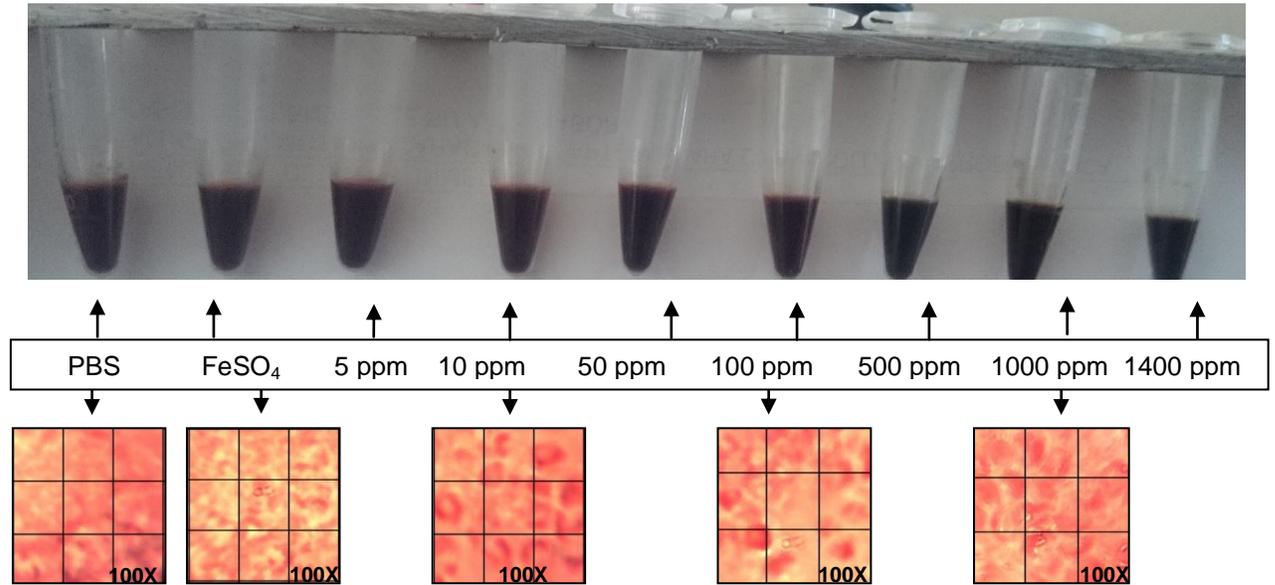
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 13. Tubos eppendorf con extracto de manzana (acetato de etilo), día 14.



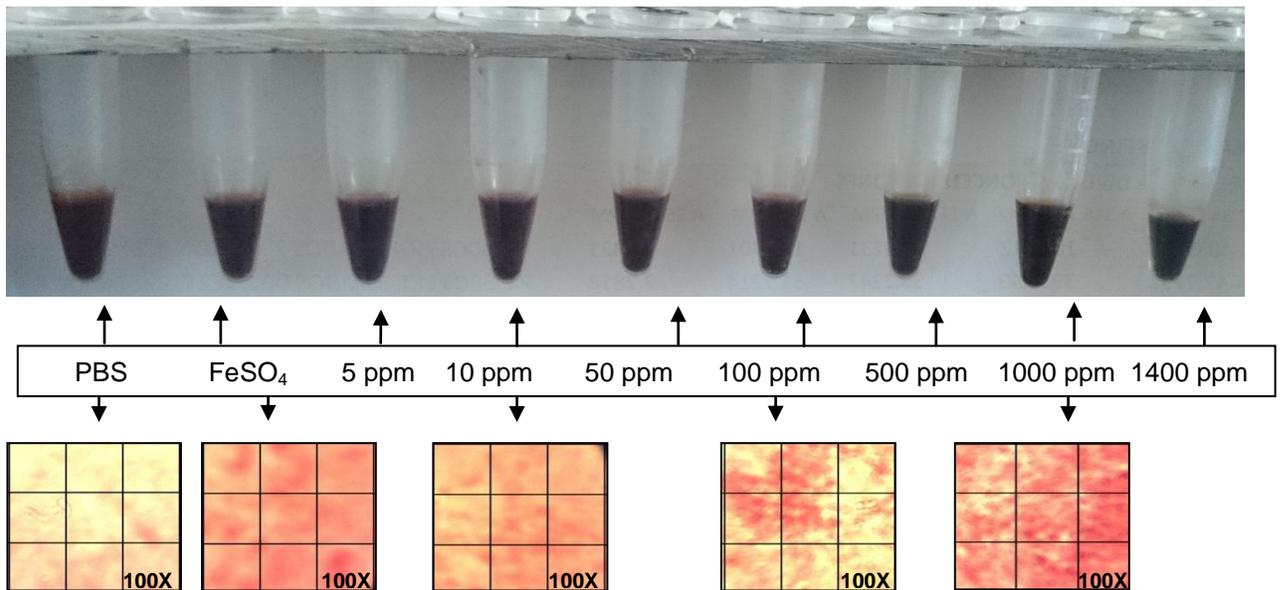
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 14. Tubos eppendorf con extracto de manzana (acetato de etilo), día 21.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

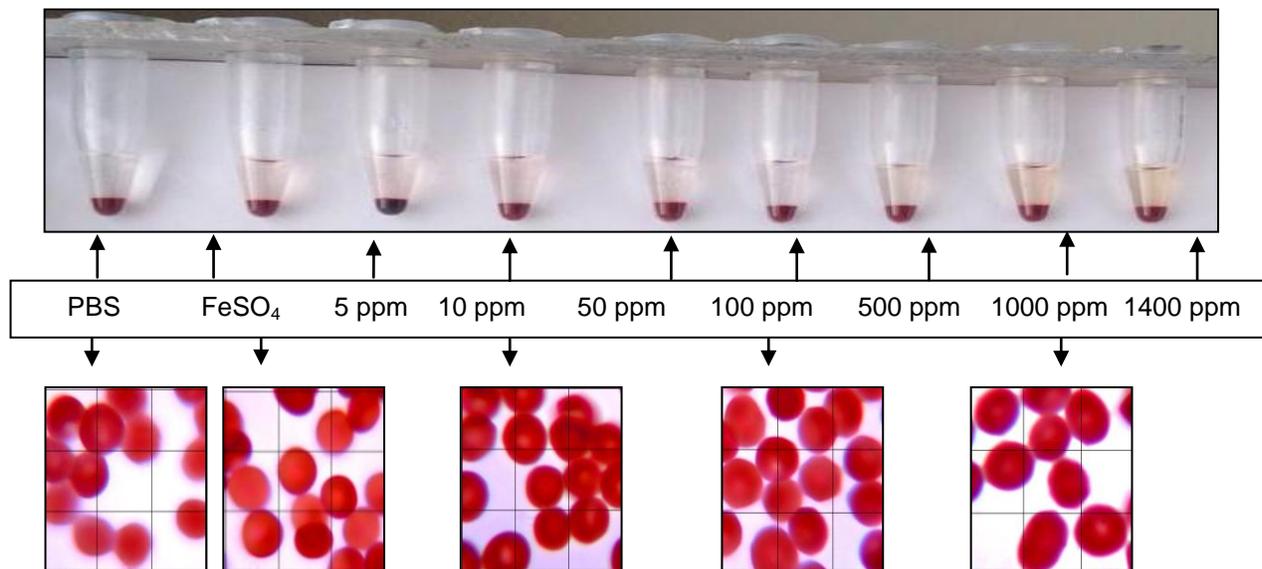
Figura 15. Tubos eppendorf con extracto de manzana (acetato de etilo), día 28.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

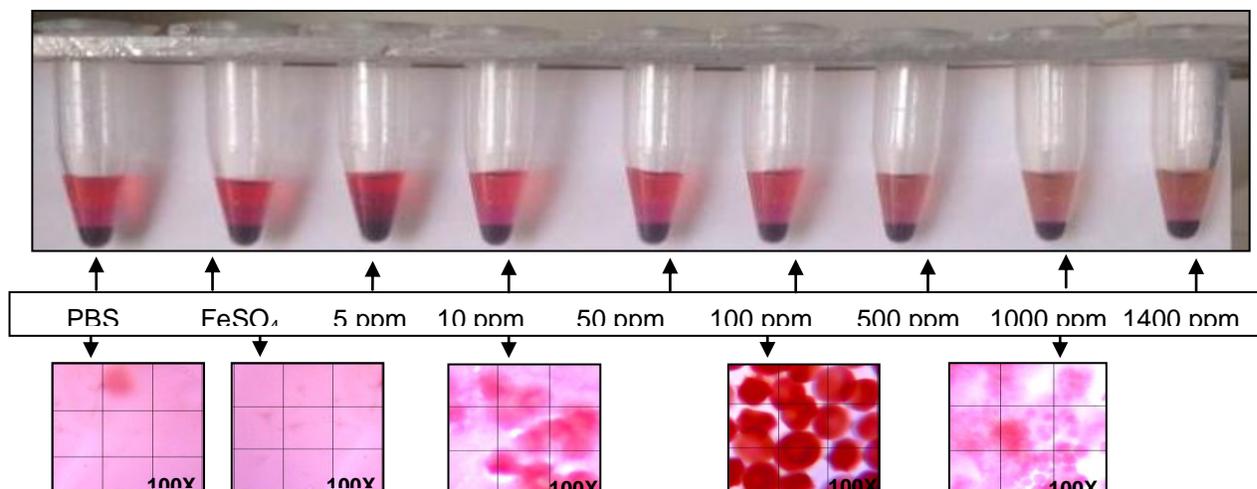
Para probar la efectividad del otro extracto manejado de tejocote se utilizaron las mismas condiciones experimentales ya mencionadas.

Figura 16. Tubos eppendorf con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 0.



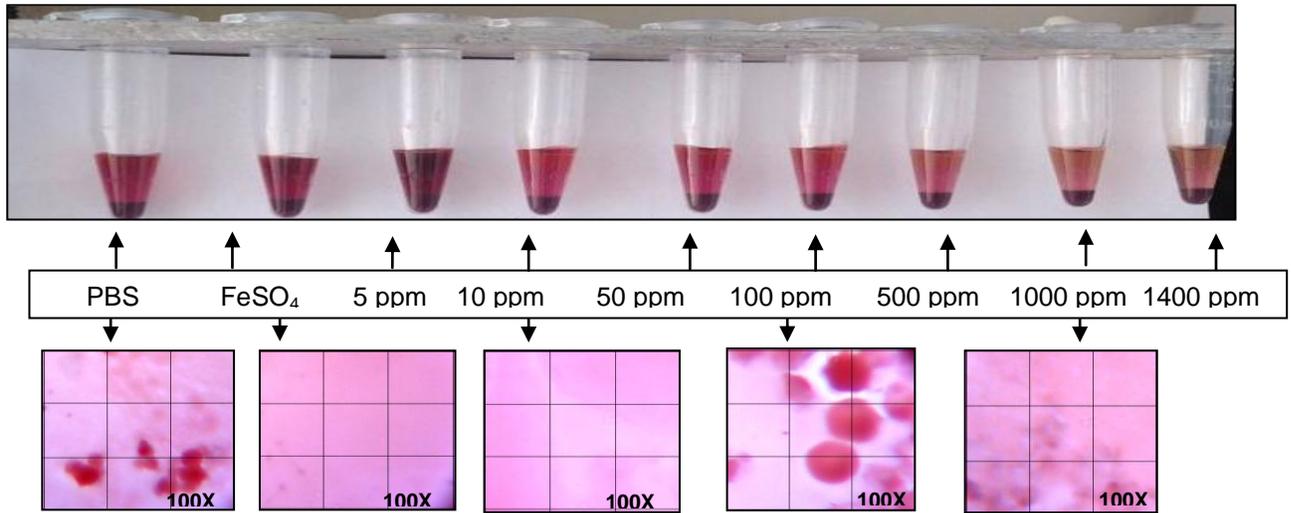
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 17. Tubos eppendorf con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 7.



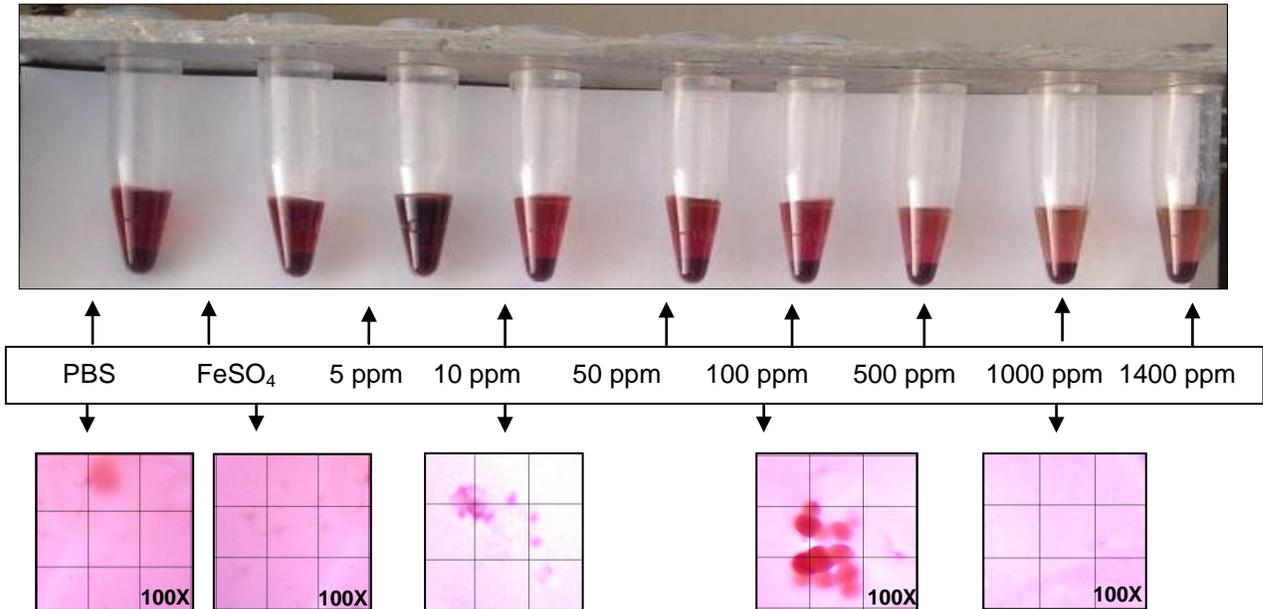
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 18. Tubos eppendorf con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 14.



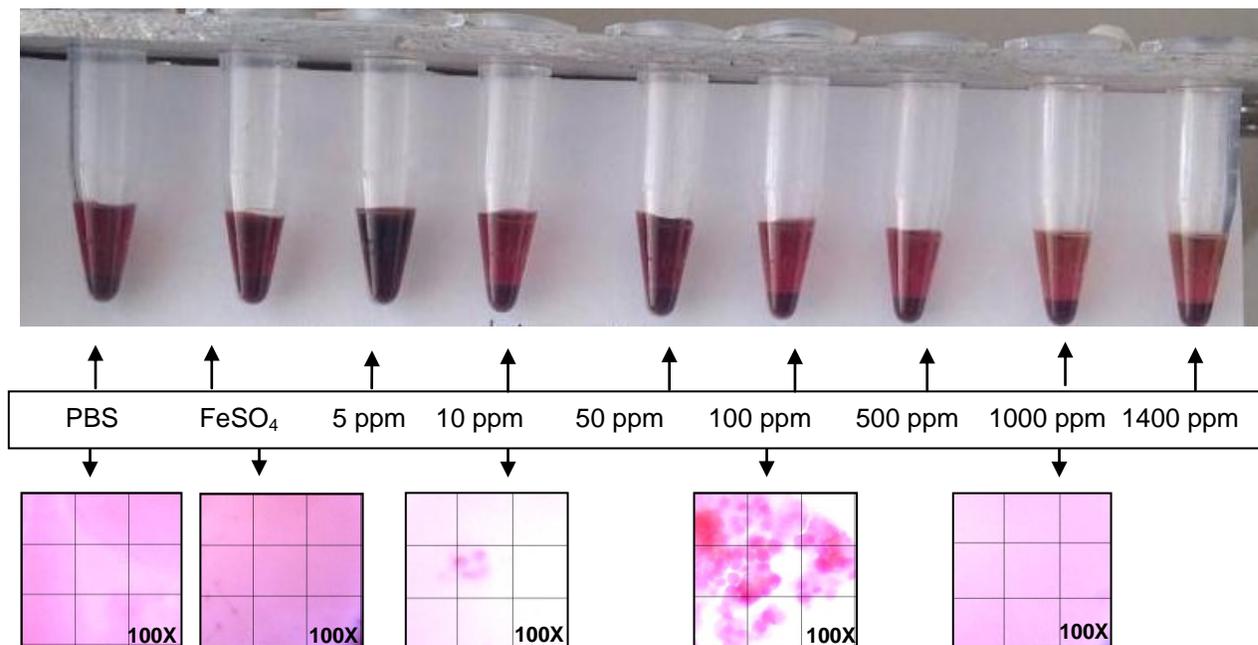
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 19. Tubos eppendorf con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 21.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 20. Tubos eppendorf con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 28.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

El grado de hemólisis de los eritrocitos con las diferentes concentraciones de los extractos; mostro una correlación entre el tiempo y el daño a los eritrocitos durante los 28 días de incubación. Los eritrocitos sometidos en la menor concentración de los extractos sufrieron un mayor daño, se observó también el daño producido por el oxidante así como la protección del extracto de tejocote a 100 ppm; observándose directamente en los tubos una menor presencia de hemoglobina liberada.

Otra prueba que se realizo fue la de electroforesis, esta prueba se realizó a las 2 horas de incubación y a los 7 días de incubación, para el día 7 el tubo eppendorf que contiene los eritrocitos deben someterse a movimiento para tomar una muestra homogénea. El gel a correr es de tipo aniónico, se necesitan 9 tubos eppendorf para la realización de la prueba. En cada tubo eppendorf se colocaron 20 µL de SDS, posteriormente se agregaron 5 µL de muestra de cada tubo descrito anteriormente y se agita suavemente.

1. Para el llenado de pozos se colocaron 3 μL de cada tubo y de marcador de peso molecular (MWP) se colocaron 5 μL .



Figura 21. Llenado de pozos del gel

2. El gel se corre a 100 volts durante hora y media
3. Ya gelificado se coloca en solución fijadora para evitar que las proteínas puedan modificarse.
4. Posteriormente se tiñe con azul de Comassie y después de una semana el gel debe desteñirse.
5. Para el conteo de bandas el gel debe estar previamente seco.

7.5 Conteo de bandas de proteínas en geles de diferentes días

Para determinar las bandas de proteínas en cada gel se utilizó un marcador de peso molecular en cada corrida.

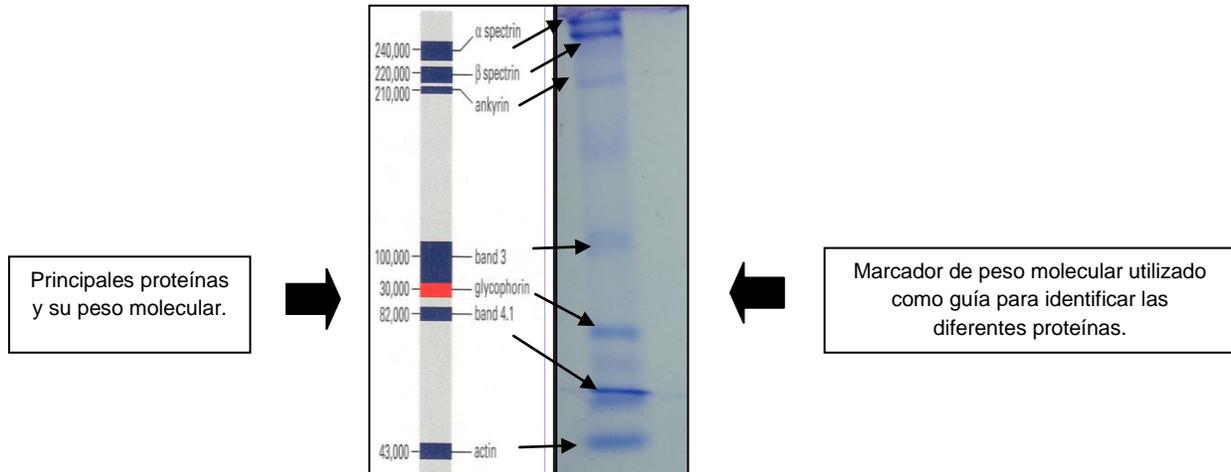


Figura 22. Identificación de proteínas

PRUEBA 1.

Se inició con la prueba de electroforesis, para corroborar la pureza de los extractos se decidió elaborar un gel para cada extracto. Al finalizar la prueba se corroboró la inexistencia de alguna impureza en el gel que pudiera afectar los resultados.



Figura 23. Gel con extracto de manzana

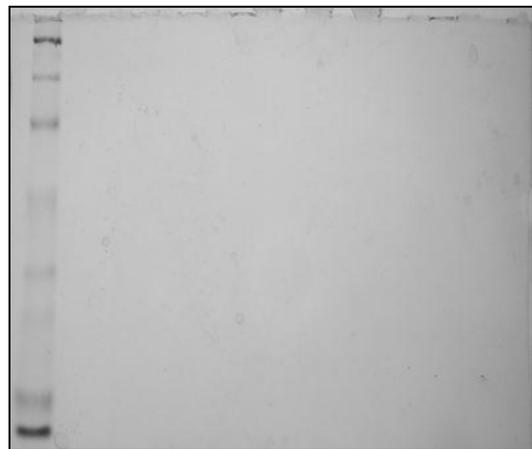


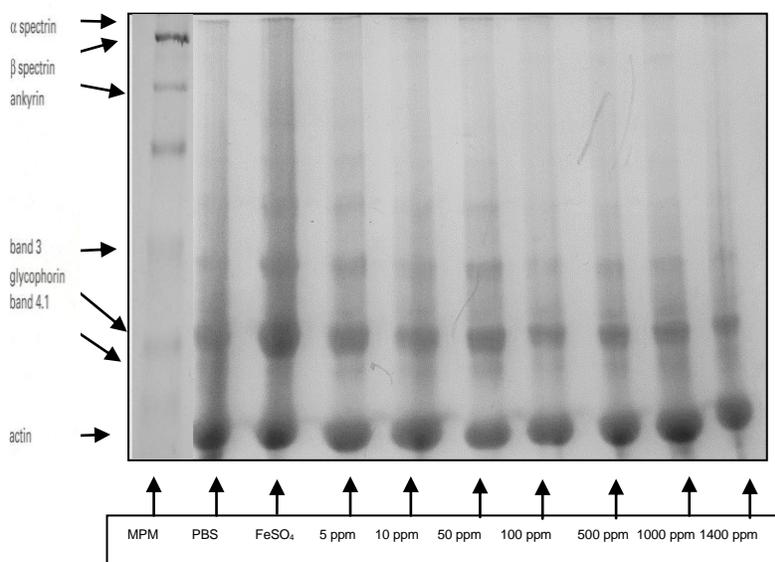
Figura 24. Gel con extracto de manzana

Previo a los experimentos se incubaron las muestras con los extractos antes mencionados, se realizaron diferentes experimentos para determinar el tiempo en el cual se reportarían los resultados y asegurar que no interfiriera el envejecimiento natural de las células.

Posteriormente se realizaron las pruebas correspondientes para determinar el efecto antioxidante de ambos extractos en los eritrocitos humanos. El día 0 corresponde a 2 horas de incubación, se reportaron los resultados de los días 0, 7, 14, 21, 28 días.

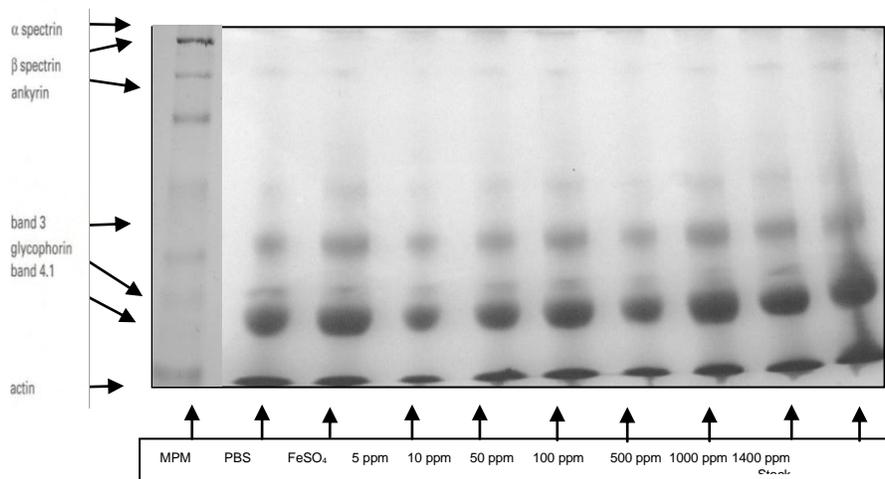
Figura 25. Gel con extracto de manzana (acetato de etilo), día 0. Se observa la presencia de las proteínas como espectrina, ankirina, banda 3, glicoforina, banda 4.1.

Se espera una protección mayor en las concentraciones de 100 y 1000 ppm, también se espera un mayor daño en las proteínas del grupo que contienen solo el oxidante (FeSO_4).



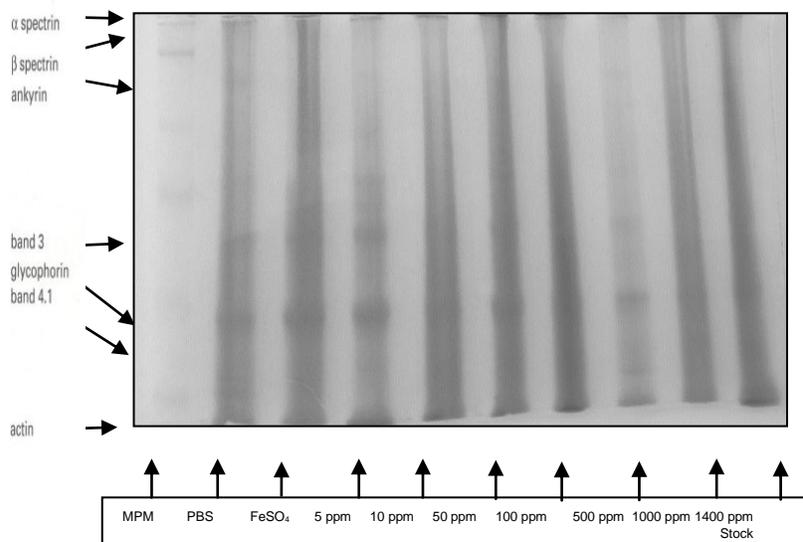
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 26. Gel con extracto de manzana (acetato de etilo), día 7. En la imagen se observa el daño ocurrido en las proteínas como espectrina y ankirina. Las proteínas presentes en el gel son banda 3, glicoforina, banda 4.1.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

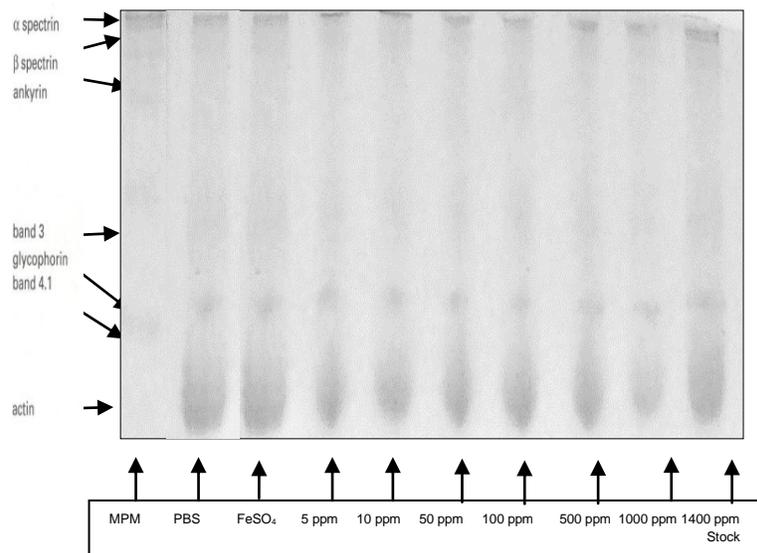
Figura 27. Gel con extracto de manzana (acetato de etilo), día 14. Al paso de los días se observó un fenómeno inesperado; la hemolisis fue uniforme en todas las concentraciones, después de desarrollar y teñir el gel se observó que no hay presencia de proteínas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

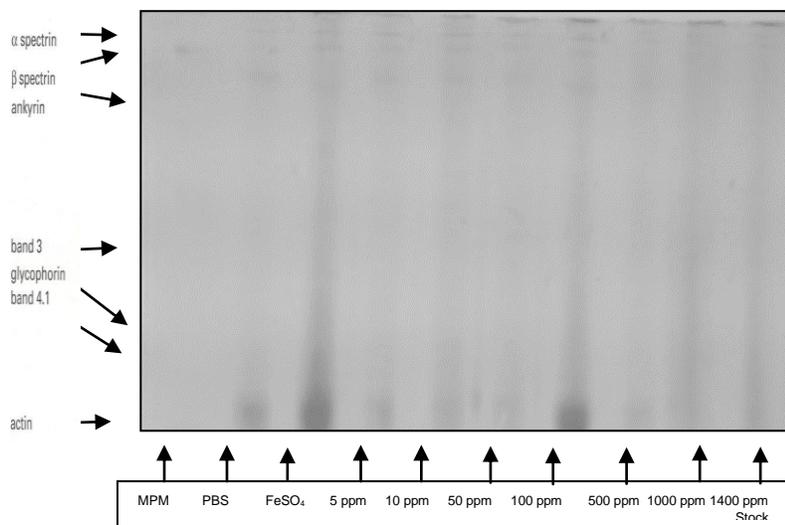
En las siguientes imágenes correspondientes a los días 21 y 28 se observa que el daño de proteínas fue inevitable.

Figura 28. Gel con extracto de manzana (acetato de etilo), día 21.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 29. Gel con extracto de manzana (acetato de etilo), día 28.

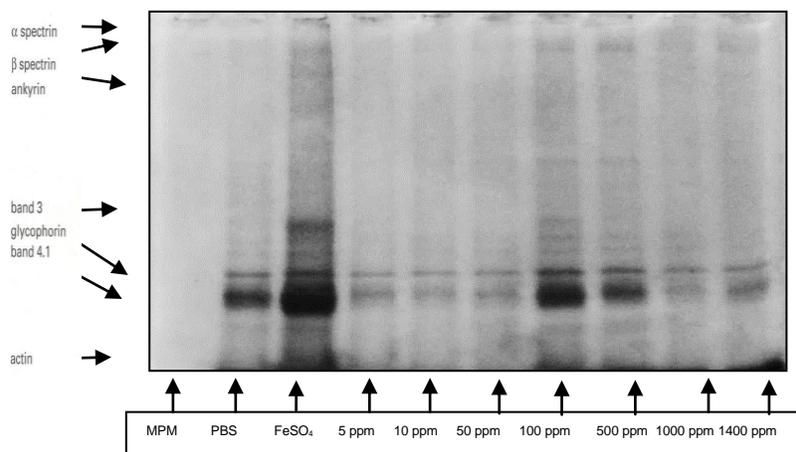


Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Para probar la efectividad del extracto de tejocote se utilizaron las mismas condiciones experimentales previamente descritas.

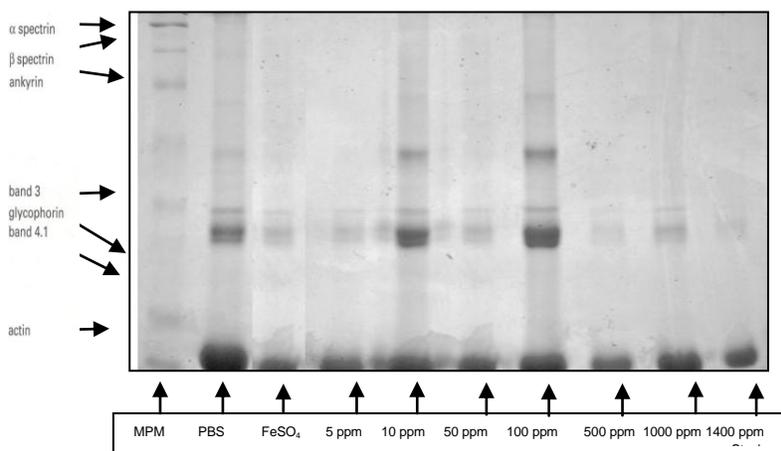
Figura 30. Gel con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 0. Se observa la presencia de las proteínas como espectrina, ankirina, banda 3, glicoforina, banda 4.1.

Se espera, de igual manera, una protección mayor en las concentraciones de 100 y 1000 ppm, también se espera un mayor daño en las proteínas del grupo que contienen solo el oxidante.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

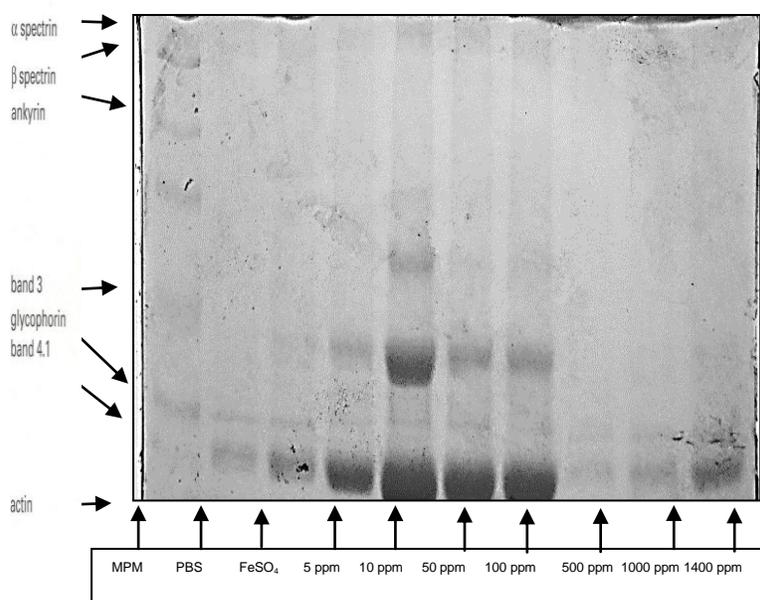
Figura 31. Gel con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 7.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

En cuanto a los resultados de tejocote se puede observar en la figura 22; las proteínas que estaban presentes al día uno empiezan a desaparecer, en la concentración de 10 y 100 ppm las proteínas se conservan, se observa que en la medida en que se aumenta la concentración del antioxidante, disminuye el factor protector que ejerce, esto demuestra que la condición óptima para el antioxidante es menor a de 100 ppm.

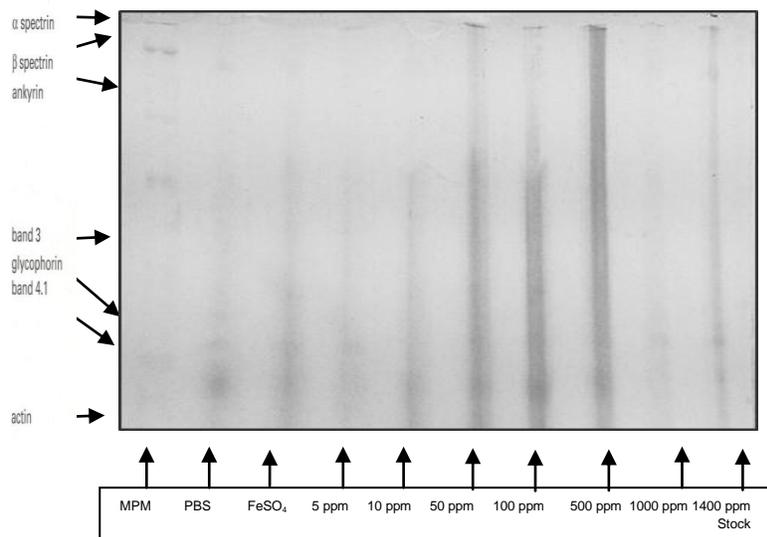
Figura 32. Gel con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 14. Las proteínas siguen el mismo patrón conservándose mejor en las concentraciones menores a 100 ppm.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

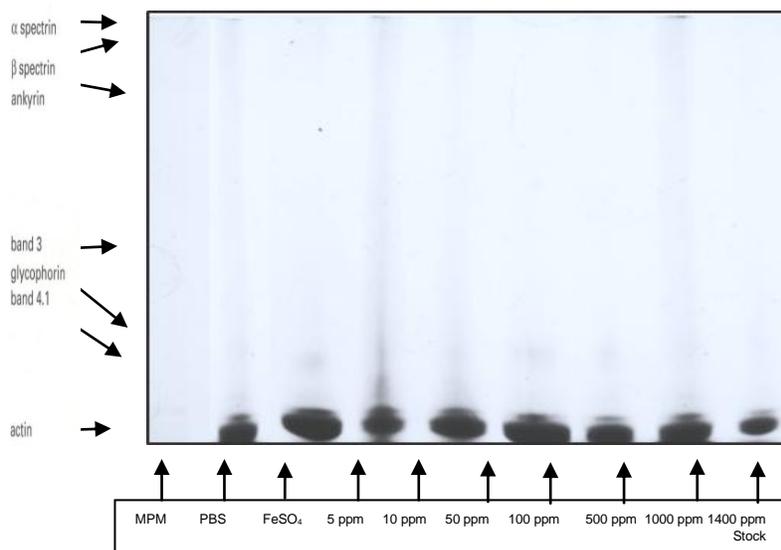
En las siguientes imágenes correspondientes a los días 21 y 28 se observa que el daño de proteínas fue inevitable.

Figura 33. Gel con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 21.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 34. Gel con extracto de tejocote (acetato de etilo), día 28.

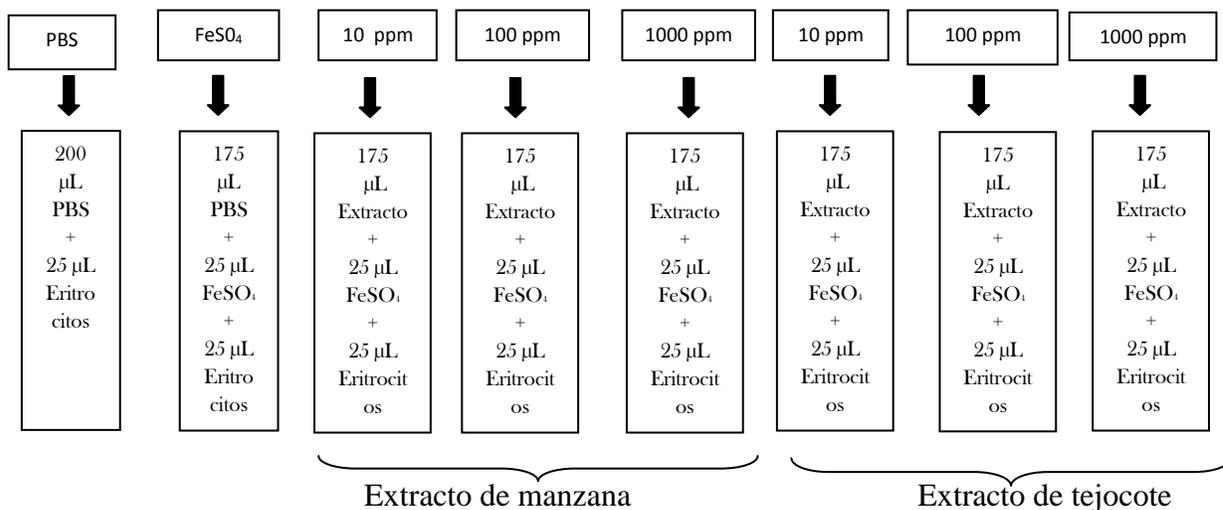


Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

PRUEBA 2.

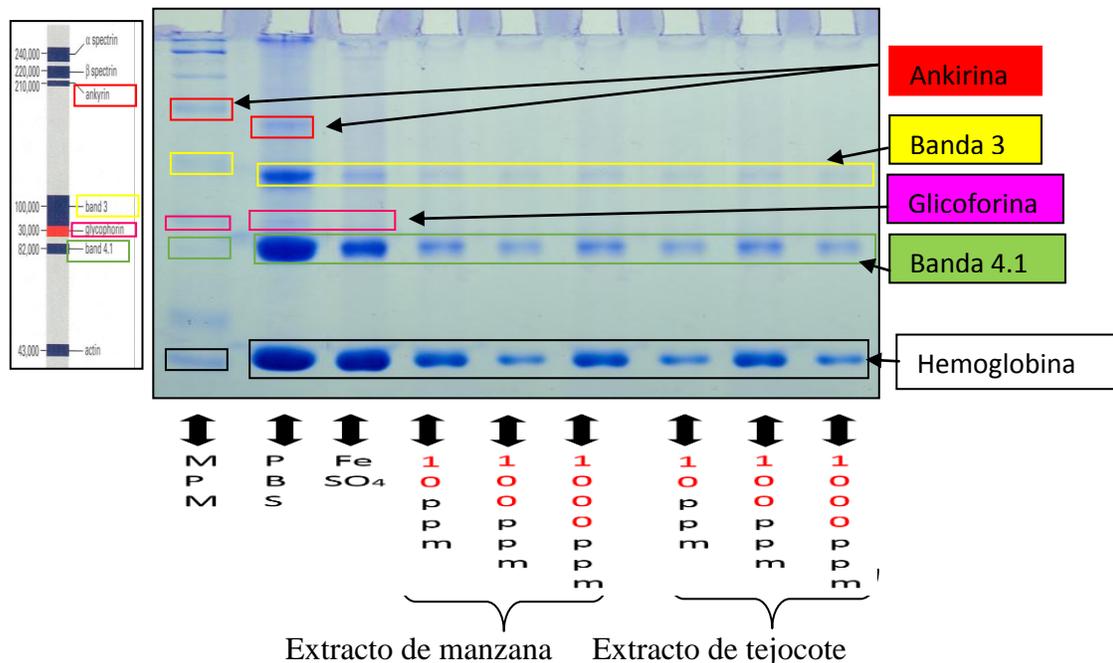
Los resultados no fueron congruentes en cuanto a la técnica de electroforesis; se esperaba observar un daño mayor en las proteínas del eritrocito, sin embargo, no se observó la reproducibilidad del control y el PBS. En cuanto a los resultados obtenidos de la intervención de los extractos se esperaba que a mayor concentración mayor inhibición de la oxidación de proteínas. Se decidió repetir los experimentos para asegurar los resultados obtenidos; se adiciono la prueba para cuantificar la hemoglobina liberada, la cual se cuantifico espectrofotométricamente a 540 nm. Los días que se reportan son el día 0 (2 horas de incubación) y el día 7. Solo se manejaron las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm de ambos extractos para obtener una mejor reproducibilidad de la prueba.

Figura 35. Descripción de las muestras para las diferentes pruebas.



Se realizó nuevamente la prueba de electroforesis bajo las mismas condiciones y se probaron solo las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm de ambos extractos. El gel de acrilamida se preparó al 10% de acrilamida. La concentración de trabajo fue de 134 µg de proteína (método de Lowry).

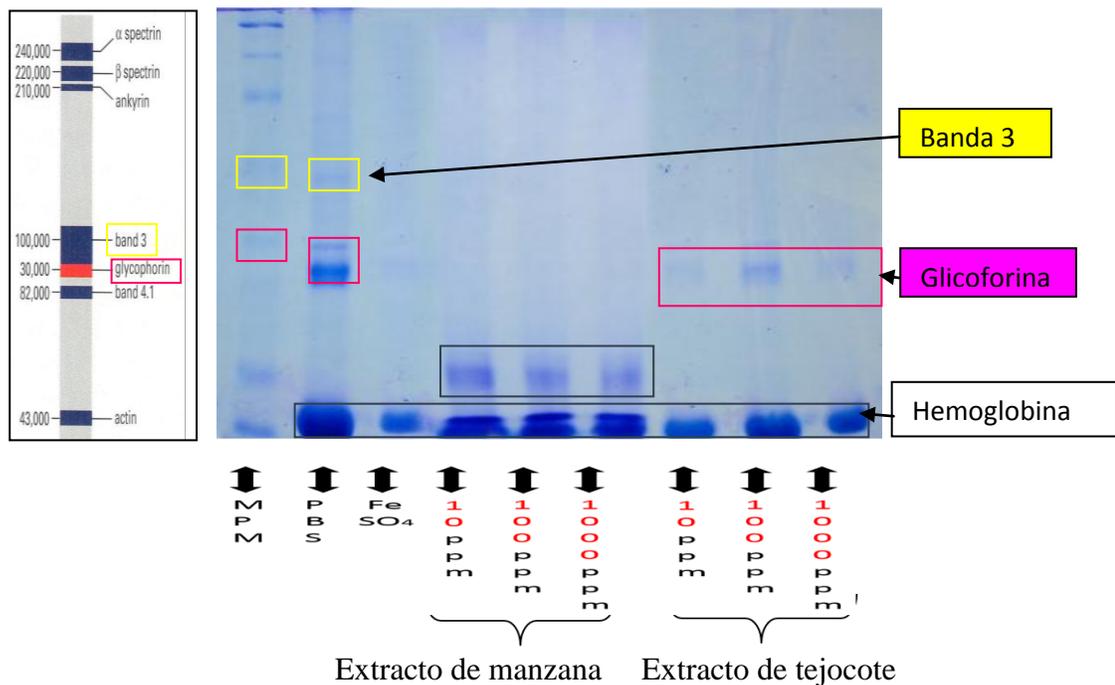
Figura 36. Gel de poliacrilamida, día 0



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Se observa la presencia de proteínas como ankirina en los grupos blanco (PBS) y control (FeSO₄). La proteína banda 3 se observa en todos los grupos experimentales, la proteína glicoforina solo se observa en el grupo blanco y control. En cuanto a la proteína banda 4.1 se observa en todos los grupos experimentales. La última proteína que se observa es la que corresponde a hemoglobina.

Figura 37. Gel de poliacrilamida, día 7



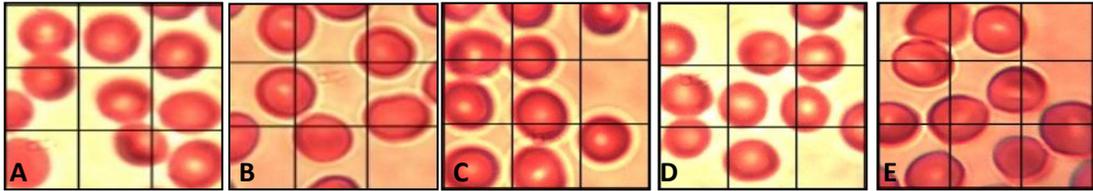
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Trascurridos 7 días de incubación se observa la presencia de proteínas como banda 3 en el grupo blanco, la proteína grlicoforina se observa en el grupo blanco y en el grupo que contienen el extracto de tejocote. En cuanto al extracto de manzana se observa la nula protección de oxidación en las proteínas.

Para la siguiente prueba realizada se utilizaron 5 µL de muestra tomada de cada uno de los tubos previamente descrito para realizar los extendidos citológicos, se colocó la muestra en porta objetos, se tiñen por el método de eosina-hematoxilina y se hicieron observaciones al microscopio (100x) para determinar la morfología celular en cada grupo experimental.

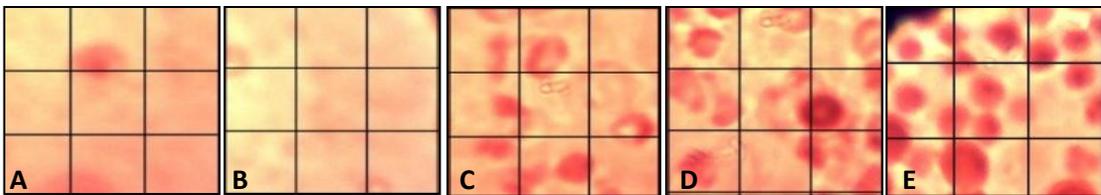
- **A:** PBS **B:** FeSO₄ **C:** 10 ppm **D:** 100 ppm **E:** 1000 ppm

Figura 38. Imagen microscópica de eritrocitos después de 2 horas de incubación con extracto de manzana: acetato de etilo



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 39. Imagen microscópica de eritrocitos después de 7 días de incubación con extracto de manzana: acetato de etilo

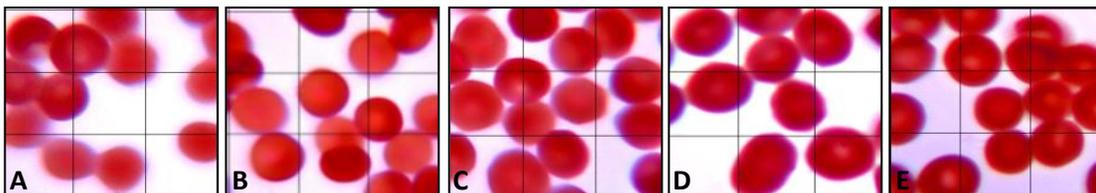


Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

En cuanto al extracto de tejocote se realizó la misma metodología y se obtuvieron los siguientes resultados:

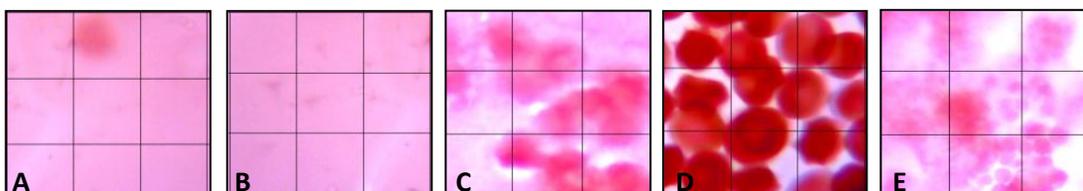
- **A:** PBS **B:** FeSO₄ **C:** 10 ppm **D:** 100 ppm **E:** 1000 ppm

Figura 40. Imagen microscópica de eritrocitos después de 2 horas de incubación con extracto de manzana: acetato de etilo



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 41. Imagen microscópica de eritrocitos después de 7 días de incubación con extracto de manzana: acetato de etilo

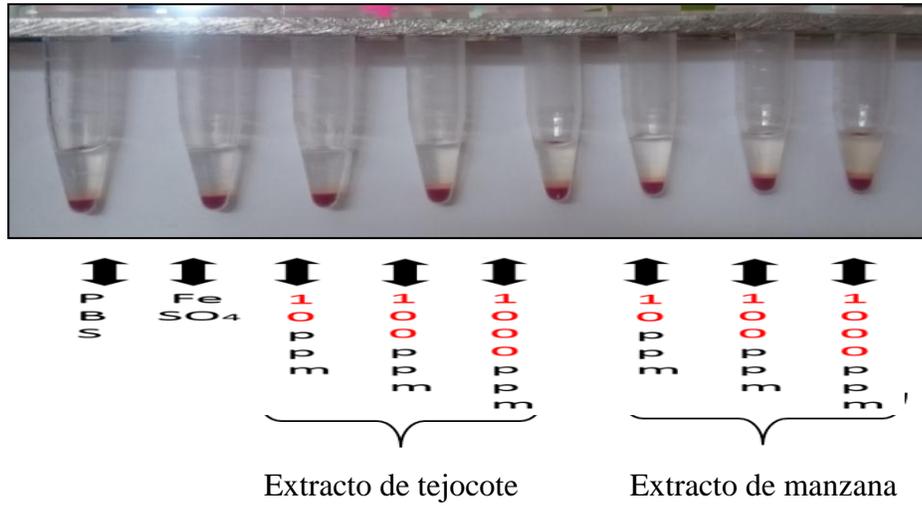


Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

En esta prueba se observaron cambios entre el grupo control (solo oxidante) y el grupo experimental (diferentes concentraciones), transcurridos 7 días se puede observar el daño que el oxidante ocasionó en los eritrocitos; así como, la protección que se obtuvo por los extractos. El extracto de manzana no protegió de manera esperada a los eritrocitos sin en cambio se observan eritrocitos de diferente morfología; el extracto de tejocote presenta un mayor efecto antioxidante en la concentración de 100 ppm.

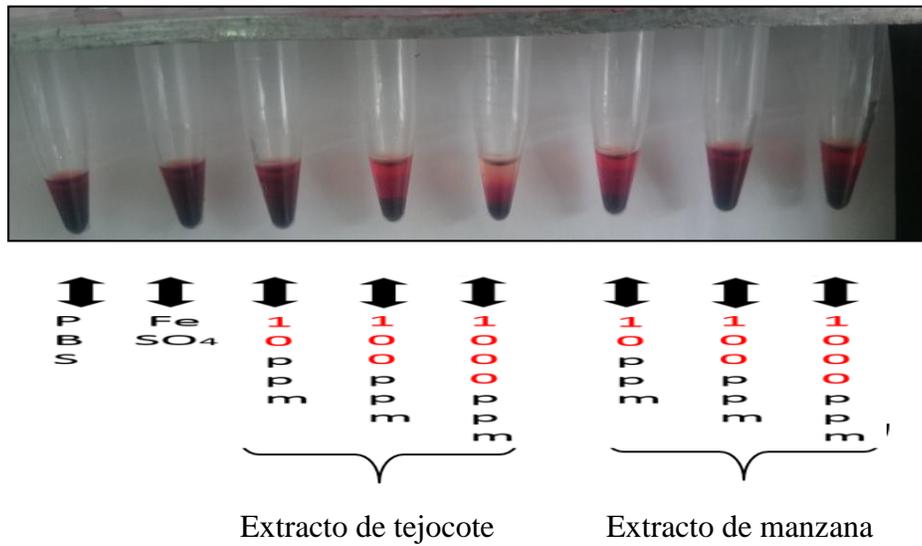
La siguiente prueba realizada fue la de inhibición de hemólisis, se utilizaron las mismas condiciones experimentales, en esta prueba se observó directamente en los tubos la presencia de hemólisis (datos cualitativos). Los resultados reportados son a las 2 horas de incubación y 7 días de incubación.

Figura 42. Prueba: inhibición de hemólisis, día 0 (2 horas de incubación).



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 43. Prueba: inhibición de hemólisis, día 7.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Se decidió cuantificar la hemoglobina liberada para corroborar lo que se observó en la prueba anterior. Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- Se coloca en un tubo de ensayo 5 μL de sangre (sobrenadante) y se diluye en 2 mL de agua destilada.
- Se toman 200 μL de la solución y se deposita en una placa de 96 pozos.
- Se examina la muestra empleando agua como blanco.
- Se lee a 540 nm [61].

Los resultados de la diferentes absorbancias se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Cuantificación de hemoglobina				
Día 0				
<i>Grupo experimental</i>	<i>Absorbancia 1</i>	<i>Absorbancia 2</i>	<i>Absorbancia 3</i>	<i>Promedio</i>
PBS	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.000
FeSO ₄	0.007	0.006	0.007	0.006 \pm 0.001
Extracto de manzana				
10 ppm	0.000	0.001	0.000	0.000 \pm 0.001
100 ppm	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.000
1000 ppm	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.000
Extracto de tejocote				
10 ppm	0.000	0.001	0.000	0.000 \pm 0.001
100 ppm	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.000
1000 ppm	0.001	0.001	0.001	0.001 \pm 0.000
Día 7				
PBS	0.335	0.340	0.338	0.337 \pm 0.003
FeSO ₄	0.372	0.370	0.375	0.372 \pm 0.003
Extracto de manzana				
10 ppm	0.302	0.303	0.300	0.301 \pm 0.002
100 ppm	0.312	0.313	0.310	0.311 \pm 0.002
1000 ppm	0.319	0.320	0.320	0.319 \pm 0.001
Extracto de tejocote				
10 ppm	0.272	0.273	0.270	0.271 \pm 0.002
100 ppm	0.265	0.262	0.264	0.263 \pm 0.002
1000 ppm	0.226	0.220	0.226	0.227 \pm 0.003

Estos resultados sugieren un menor nivel de hemólisis y daño a la membrana celular de los eritrocitos; se observa que el extracto de tejocote retarda la liberación de hemólisis y por lo tanto la formación de coágulo y congregación de las células. El proceso de hemólisis es más rápido en células incubadas con oxidante.

7.6 Cuantificación de MDA por cromatografía de alta resolución (HPLC)

Para la realización de esta técnica se generó una curva de calibración de MDA preparada de la siguiente manera:

A. Preparación de hidrolizado de acetal

- Se preparó HCl 0.1 M (10 mL) 100 μ L HCl concentrado + 9.900 μ L H₂O
- Se midieron 5 μ L de TMP (tetrametoxipropano) y se aforaron a 5 mL con el HCl .1 M
- Ebullición durante 5 minutos y enfriar rápidamente en hielo

B. Preparación del stock de MDA

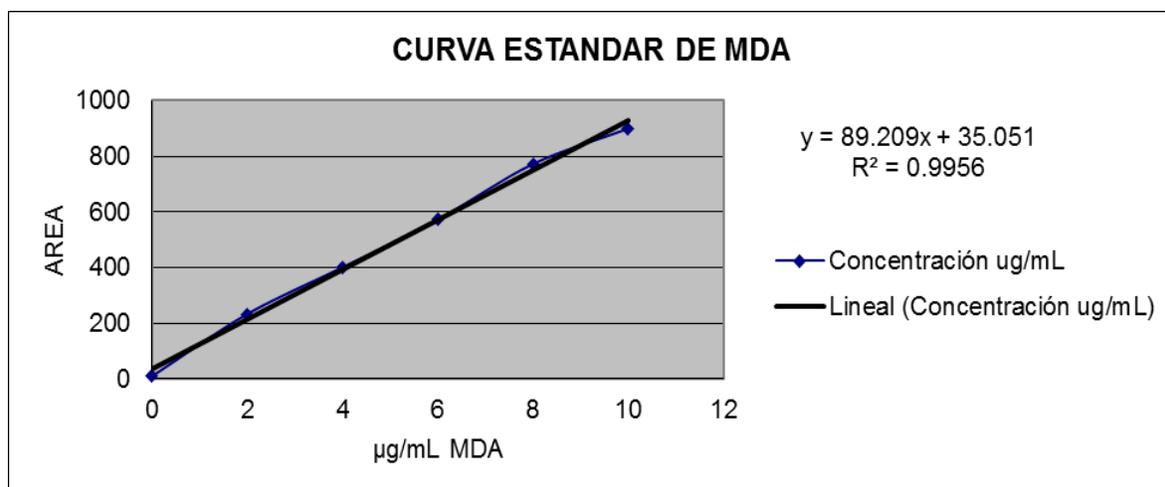
- Utilizar 1 mL del hidrolizado de acetal y aforar a 43 mL con agua nanopura
concentración final: 10 μ g MDA/mL

Se realizaron diferentes diluciones para generar la curva de calibración del MDA. Para la concentración de 2 μ g de MDA/mL se midió 200 μ L stock + 800 μ L agua, en la concentración de 4 μ g de MDA/mL se midió 400 μ L stock + 600 μ L agua, en la concentración de 6 μ g de MDA/mL se midieron 600 μ L stock + 400 μ L agua, en la concentración de 8 μ g de MDA/mL se midieron 800 μ L stock + 200 μ L agua, para la concentración de 10 μ g de MDA/mL se midió 1 mL stock.

Las inyecciones se realizaron por duplicado de cada concentración, obteniendo los siguientes resultados:

Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	Desviación media	Concentración ug/mL
8.762	8.761	8.782	8.7615	0.001	0
235	230.15	232.5	232.575	2.425	2
400	401.94	399.4	400.97	0.970	4
567.41	577.49	570.01	572.45	5.040	6
772.23	814.7	798.53	793.465	21.235	8
832.37	966.84	854.36	899.605	67.235	10

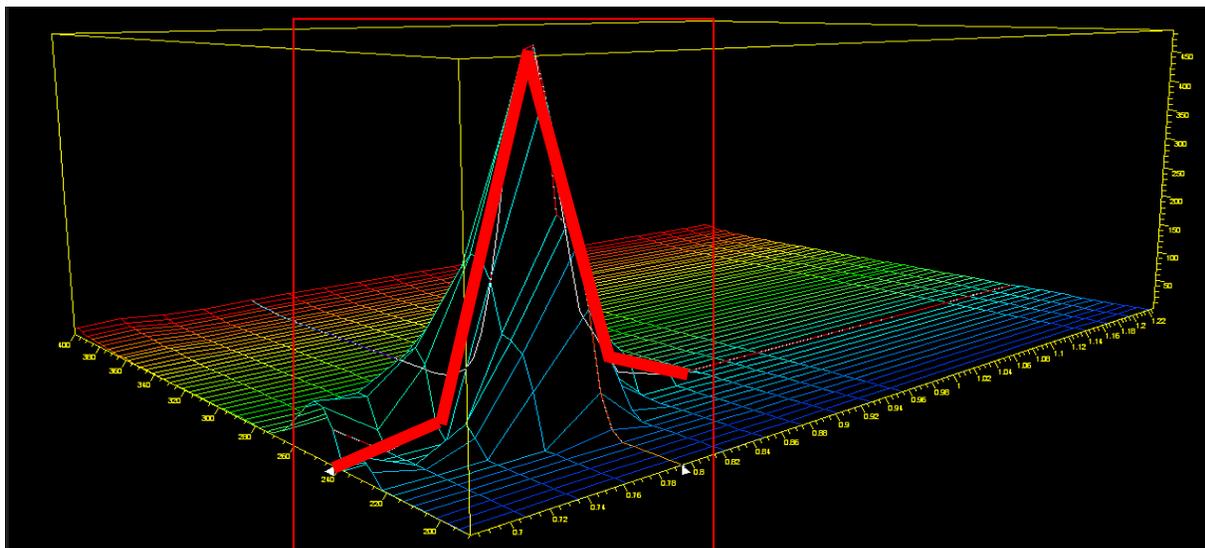
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Con el arreglo de diodos se logró identificar el pico máximo de absorción del MDA que sirvió como guía para identificar el área que genera este compuesto así como el minuto en el cual se identificaría.

Figura 44. Espectro que muestra el pico máximo de absorción del MDA a una longitud de onda de 242 nm, reportando al minuto 0.80 un área de 482.71 mAU.



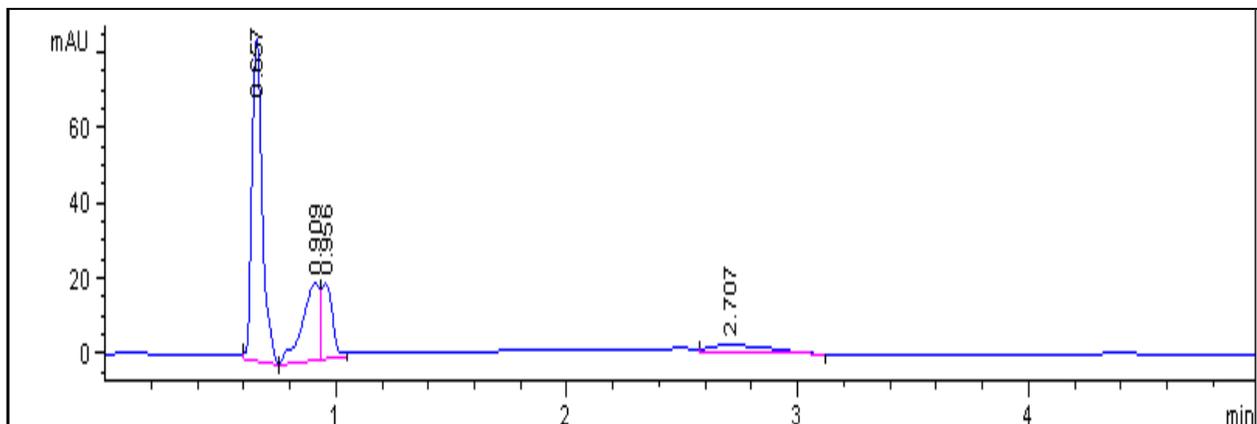
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

9.7.1 Condiciones para la lectura de MDA en eritrocitos

PRUEBA 1

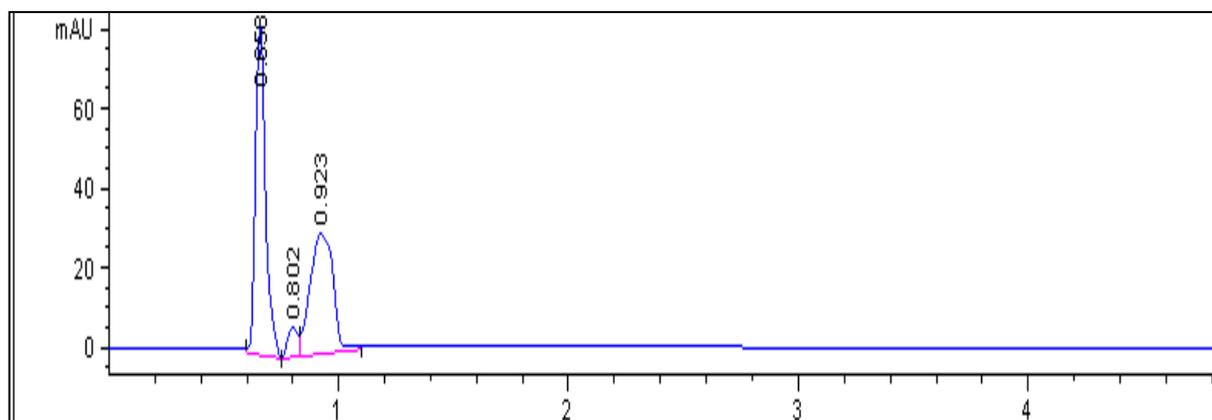
Se inició inyectado ambos extractos a las diferentes concentraciones para identificar los picos de los metabolitos que contiene. Para esta técnica se utilizó una fase móvil: 85% de ácido acético al 1% y una fase estacionaria: 15% de acetonitrilo. El tiempo de retención esperado fue de 1.44 minutos y las inyecciones fueron de 20 μ L, la longitud de onda de trabajo fue 254 nm. Se realizaron inyecciones por duplicado para obtener un promedio de cada concentración.

Figura 45. Cromatograma del extracto de manzana de acetato de etilo a 10 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm tres picos correspondientes a los metabolitos del extracto.



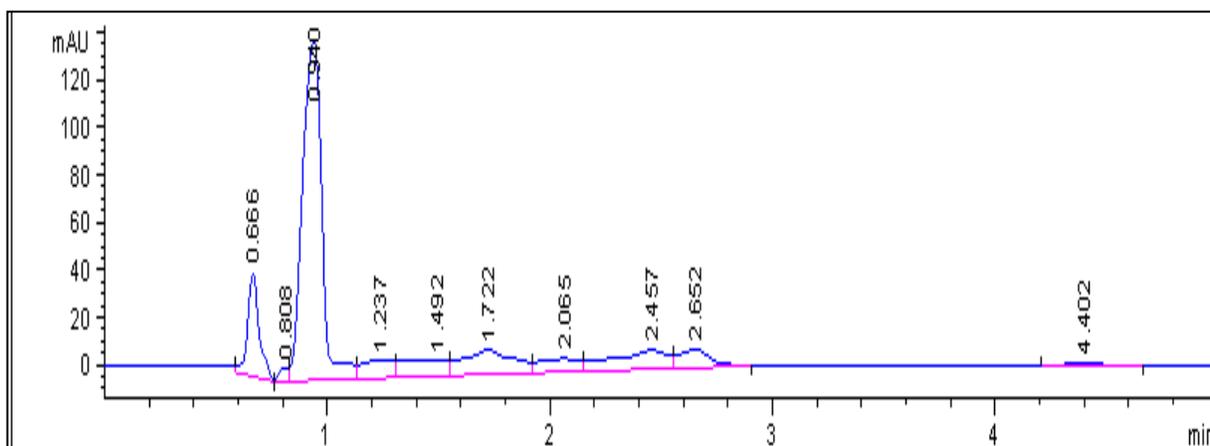
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 46. Cromatograma del extracto de manzana de acetato de etilo a 100 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm tres picos correspondientes a los metabolitos del extracto.



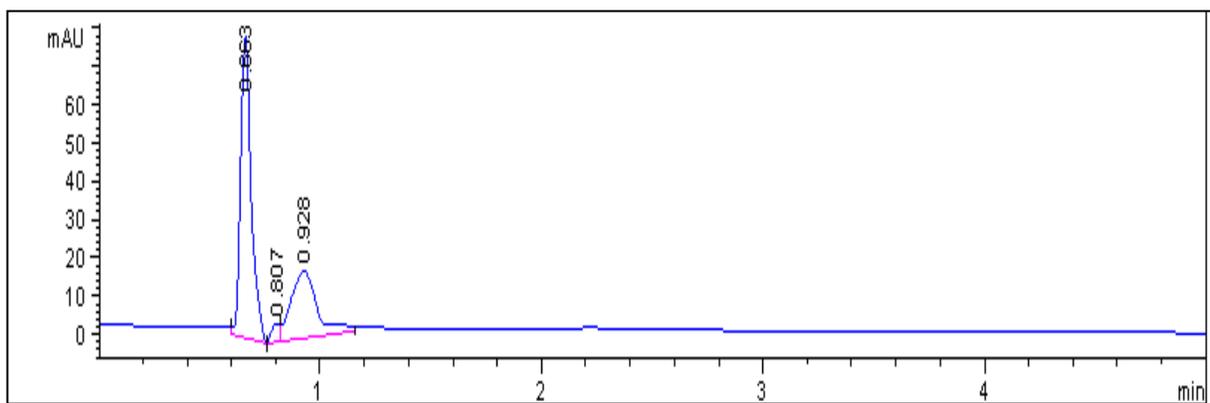
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 47. Cromatograma del extracto de manzana de acetato de etilo a 1000 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm diez picos correspondientes a los metabolitos del extracto.



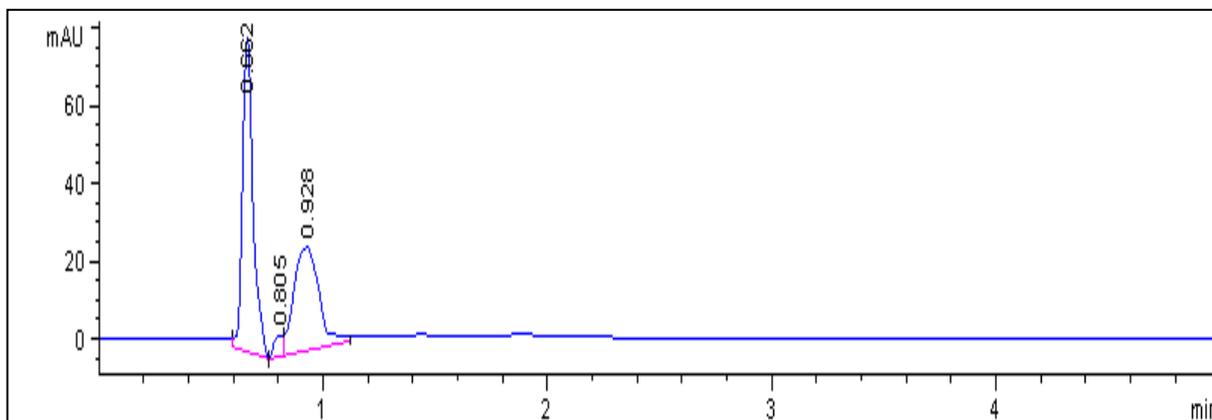
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 48. Cromatograma del extracto de tejocote de acetato de etilo a 10 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm tres picos correspondientes a los metabolitos del extracto.



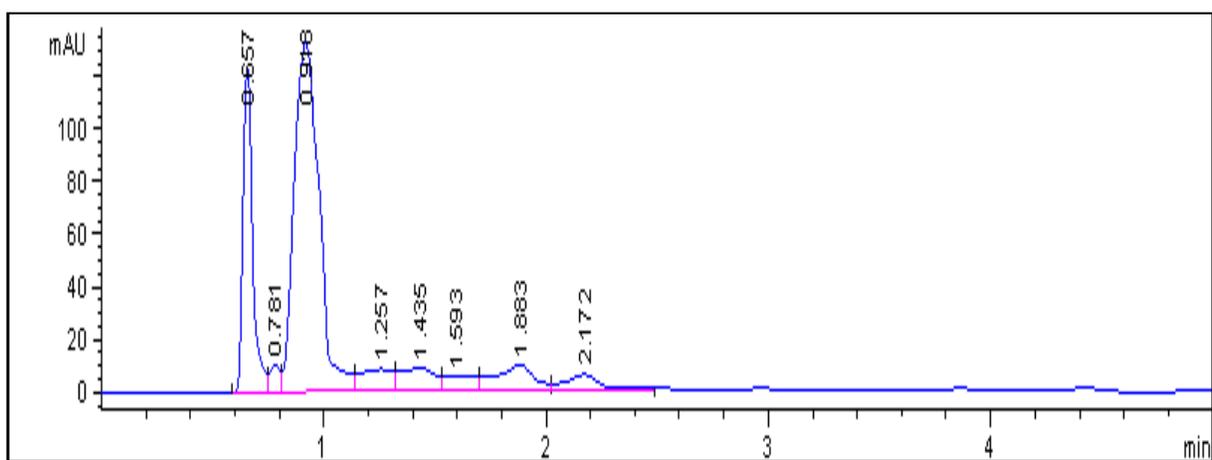
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 49. Cromatograma del extracto de tejocote de acetato de etilo a 100 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm tres picos correspondientes a los metabolitos del extracto.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 50. Cromatograma del extracto de tejocote de acetato de etilo a 1000 ppm, reportando a una longitud de onda de 254 nm tres picos correspondientes a los metabolitos del extracto.

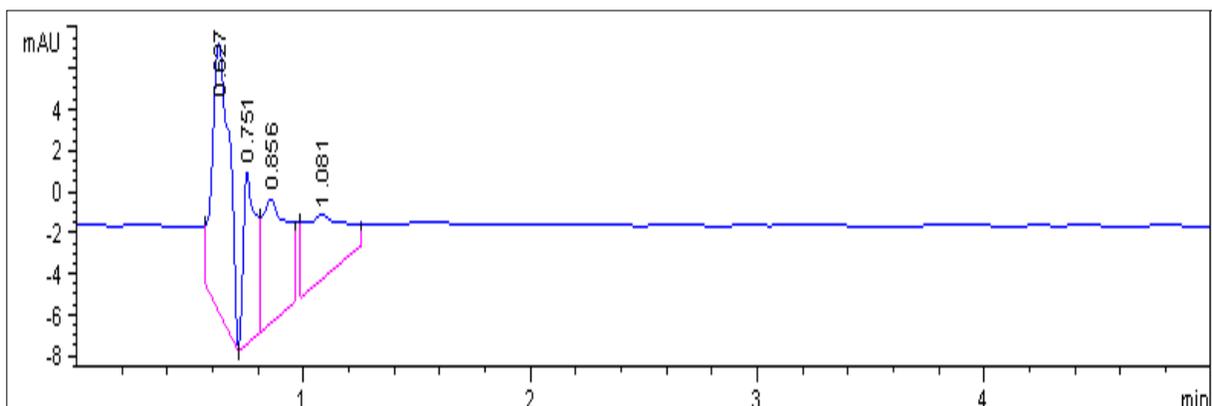


Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Con las condiciones experimentales ya establecidas se inyectó por duplicado las muestras de cada concentración (10, 100 y 1000 ppm) para identificar los picos de los metabolitos y poder diferenciar entre el pico del MDA y los picos propios de cada extracto y de cada concentración. En la figura 45, 46 y 47 se observan los picos correspondientes de cada concentración del extracto de manzana, en las figuras 48, 49 y 50 se observan los picos correspondientes del extracto de tejocote.

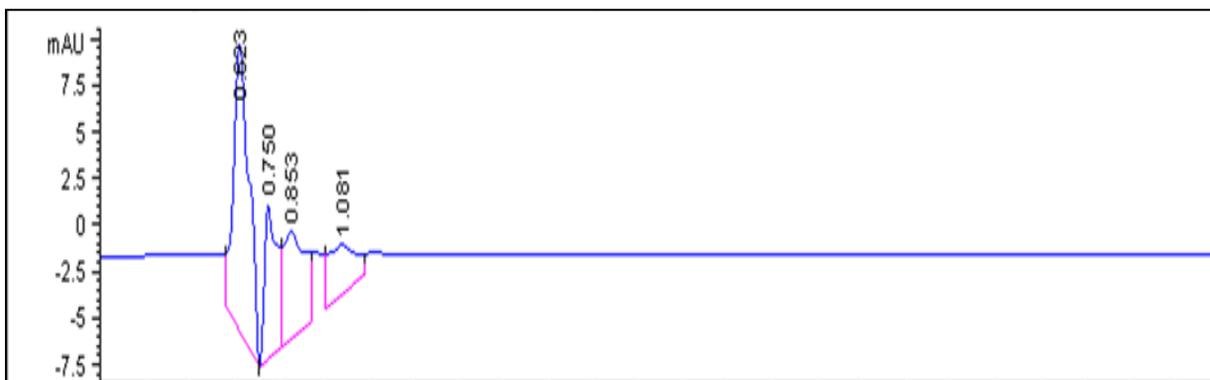
Inicialmente se inyectó el grupo blanco y control para identificar el daño que el oxidante ocasionó en los eritrocitos y contabilizar la cantidad de MDA liberado en un tiempo de incubación de 2 horas.

Figura 51. El cromatograma del grupo blanco (PBS + eritrocitos) muestra al minuto 0.75 un área de 8.45 mAU correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 52. El cromatograma del grupo control (FeSO₄ + eritrocitos) muestra al minuto 0.75 un área de 10.28 mAU correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-3015.

Posteriormente se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde y = absorbancia, $b= 35.051$, $m= 89.209$.

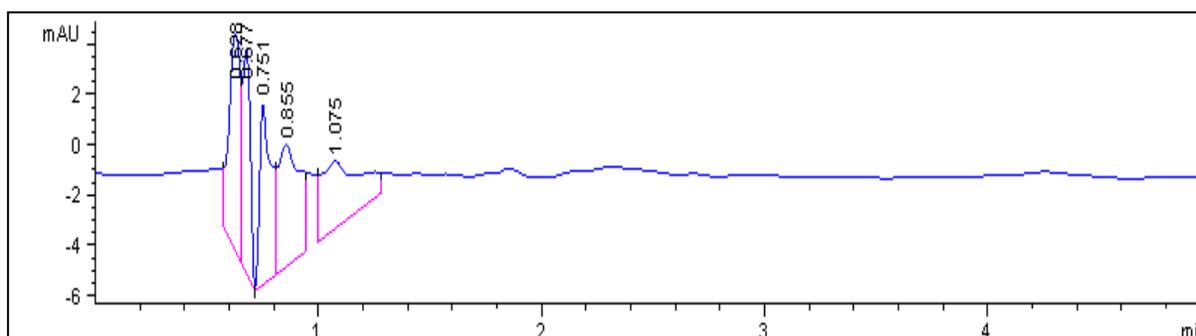
Grupo experimental	1ra inyección (µg de MDA)	2da inyección (µg de MDA)	Promedio (µg de MDA)
DIA 0 (2 horas de incubación)			
PBS	0,75	0,79	0,77
FeSO4	2,24	1,03	1,64

El grupo blanco con 2 horas de incubación genero 0,77 µg de MDA, el grupo control genero 1,64 µg de MDA. A pesar de que el aumento de MDA no es significativo aun, se observa un incremento en la producción.

PRUEBA 2.

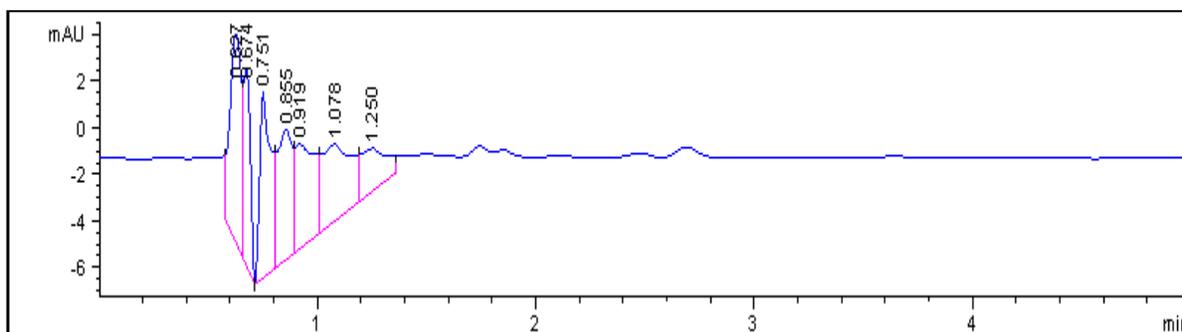
Se inició inyectando el extracto a 10, 100 y 1000 ppm, estos tubos también contienen eritrocitos. Con esta prueba se descarta el posible daño que el extracto ocasiona en los eritrocitos.

Figura 53. Cromatograma del extracto de manzana a 10 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 7.26 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



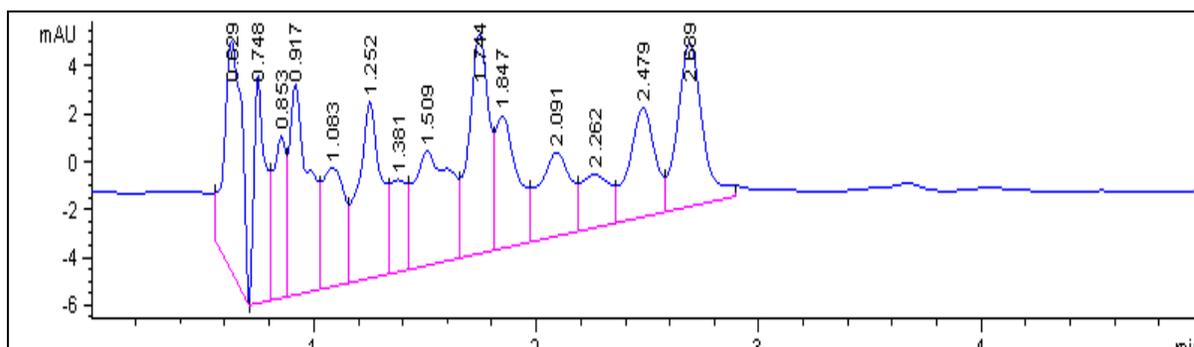
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 54. Cromatograma del extracto de manzana a 100 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 7.94 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

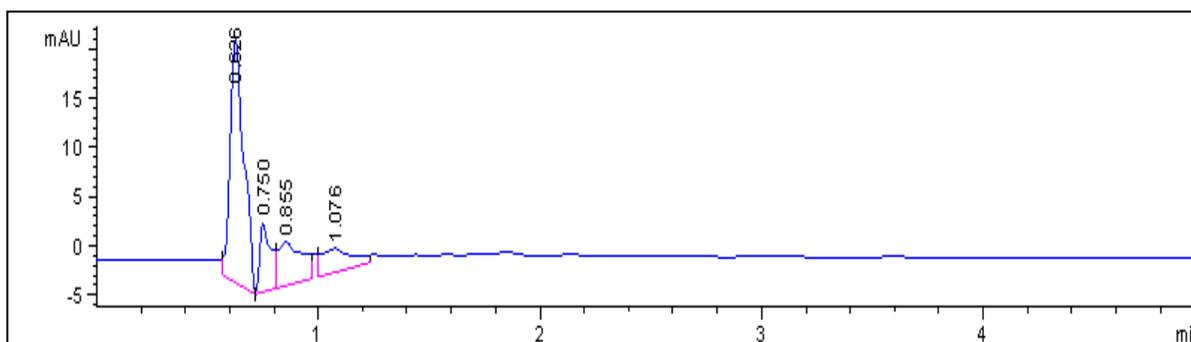
Figura 55. Cromatograma del extracto de manzana a 1000 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 8.09 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

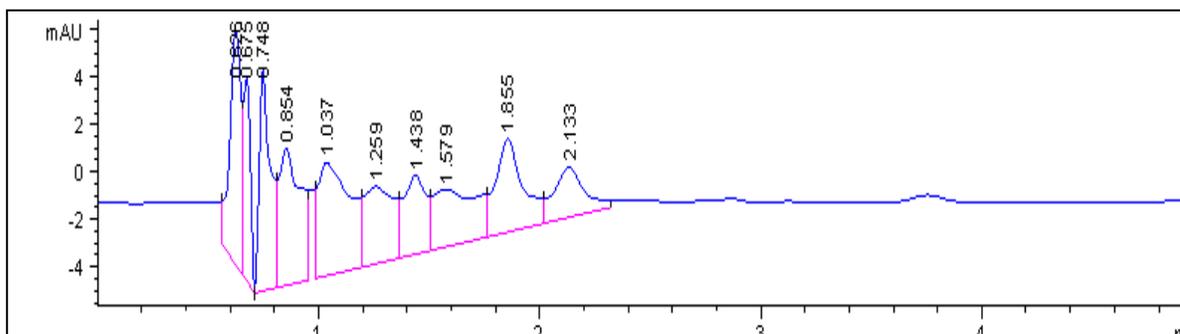
En cuanto al extracto de tejocote se obtuvieron los siguientes los resultados:

Figura 56. Cromatograma del extracto de tejocote a 10 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 7.00 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



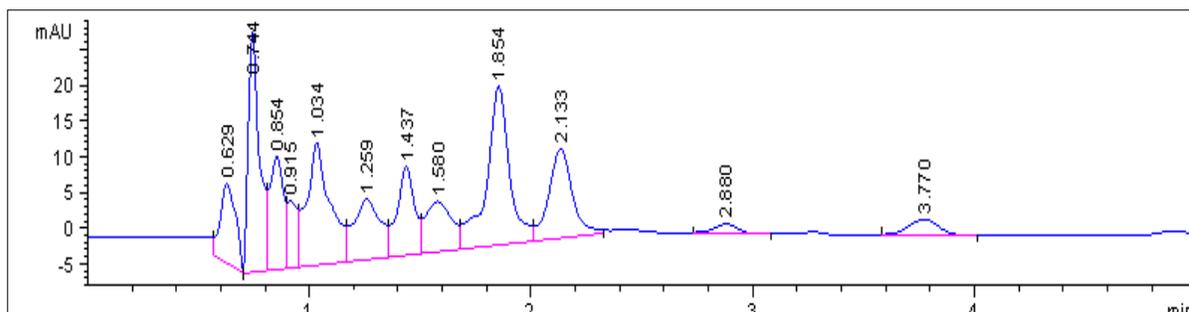
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 57. Cromatograma del extracto de tejocote a 100 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 7.00 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 58. Cromatograma del extracto de tejocote a 1000 ppm y eritrocitos, con un tiempo de incubación de 2 horas. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 7.10 correspondiente al pico del MDA; el tiempo de incubación fue de 2 horas.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Posteriormente se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde y = absorbancia, $b= 35.051$, $m= 89.209$.

Los resultados no fueron significativos por lo cual se puede corroborar que el extracto de manzana y tejocote no daña los eritrocitos.

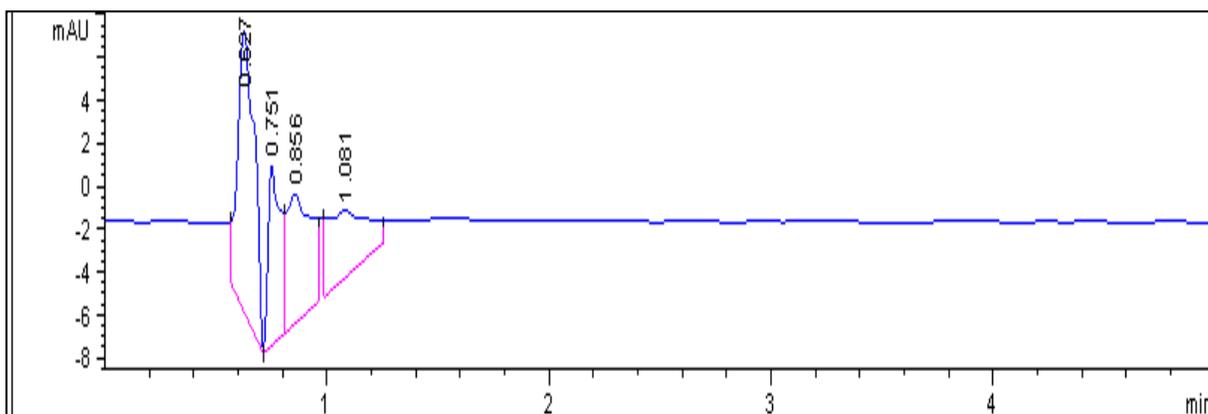
Se observa en las figuras 53, 54 y 55, correspondientes al extracto de manzana, que el área bajo la curva no aumento, por lo que no fue necesario calcular la concentración de MDA. En cuanto al extracto de tejocote se observa en las figuras 56, 57 y 58 que el área tampoco aumenta significativamente, por lo cual se descarta la posibilidad de que el extracto por si solo genere algún daño.

PRUEBA 3.

En esta prueba se pretende cuantificar los μg de MDA generados en el día 7 así como corroborar el tiempo de vida del MDA.

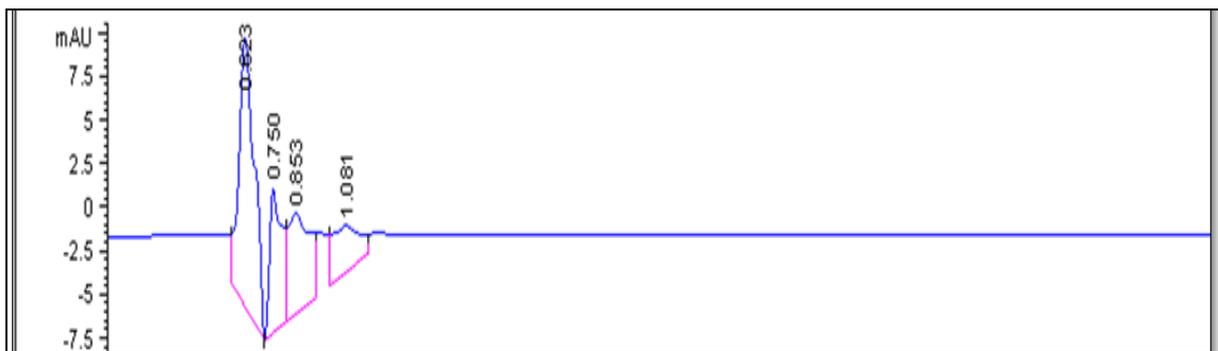
Se inicia con las inyecciones del grupo blanco y control. Más adelante se reporta la cantidad de MDA generado en un tiempo de incubación de 7 días.

Figura 59. Cromatograma del grupo blanco, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 21.24 correspondiente al pico del MDA.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

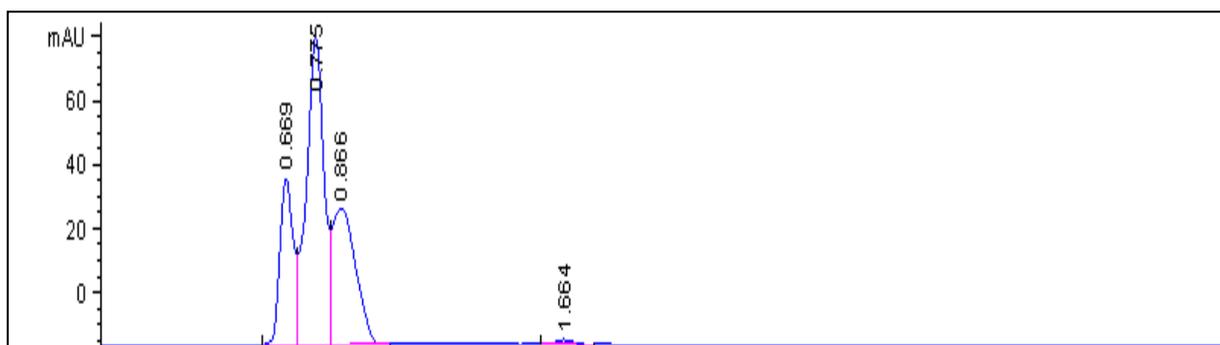
Figura 60. Cromatograma del grupo control, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 40.79 correspondiente al pico del MDA.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015

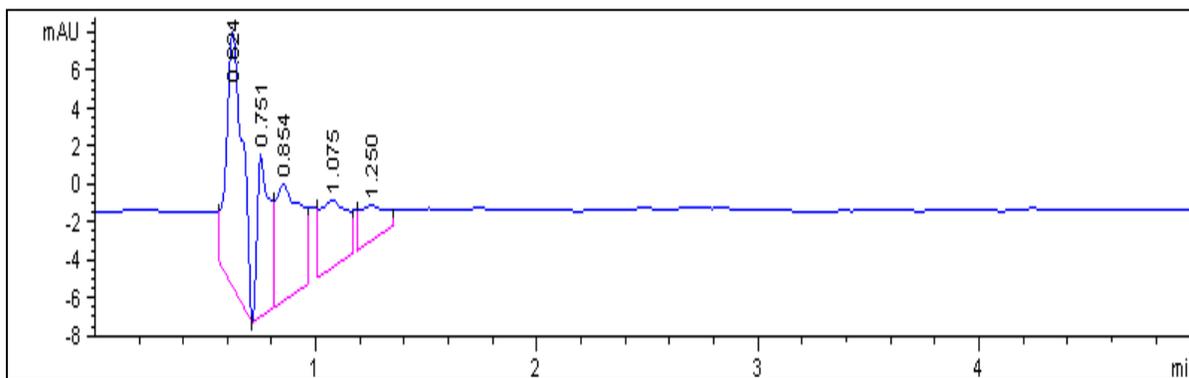
Siguiendo con la prueba se inyectaron las muestras que contiene el oxidante más las diferentes concentraciones del extracto.

Figura 61. Cromatograma del grupo experimental extracto de manzana a 10 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 11.24 correspondiente al pico del MDA.



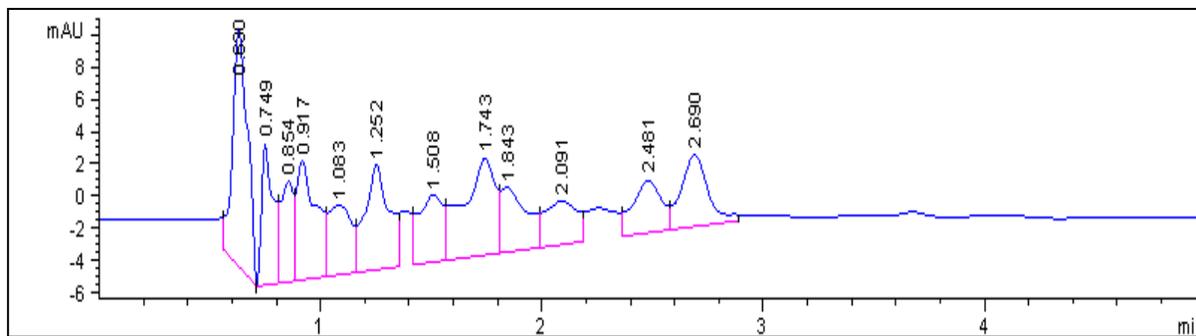
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 62. Cromatograma del grupo experimental extracto de manzana a 100 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 13.78 correspondiente al pico del MDA.



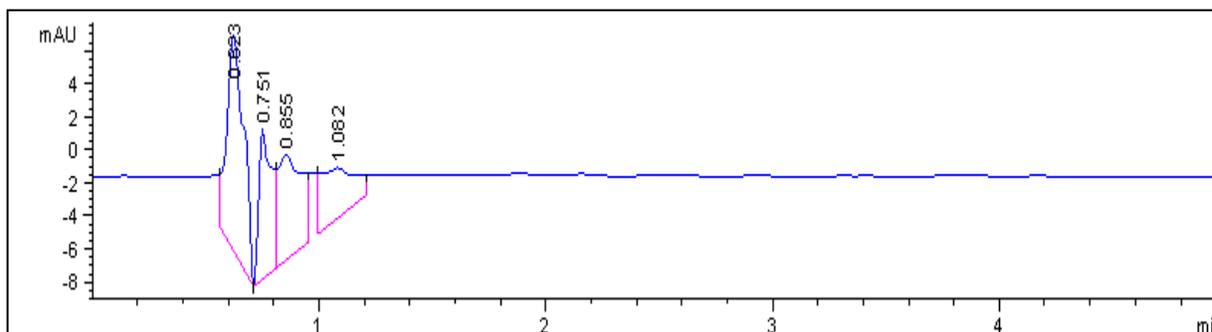
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 63. Cromatograma del grupo experimental extracto de manzana a 100 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 15.08 correspondiente al pico del MDA.



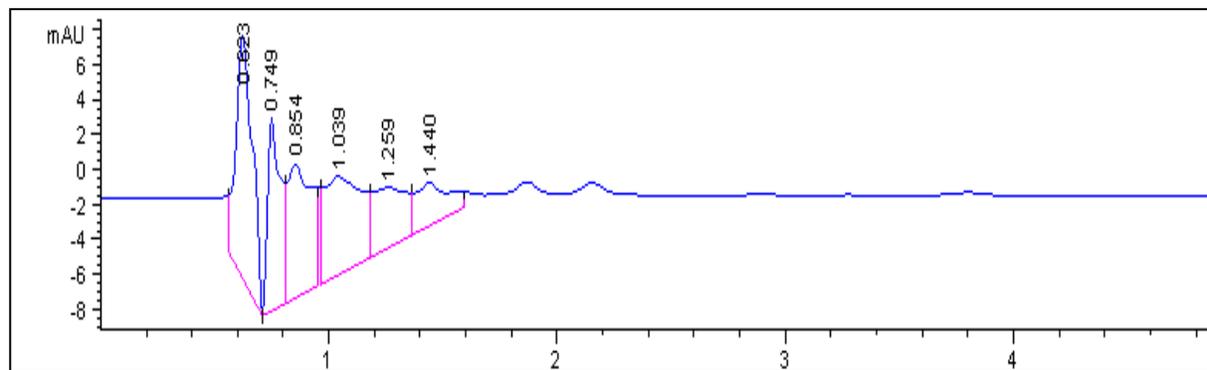
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 64. Cromatograma del grupo experimental extracto de tejocote a 10 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 11.09 correspondiente al pico del MDA.



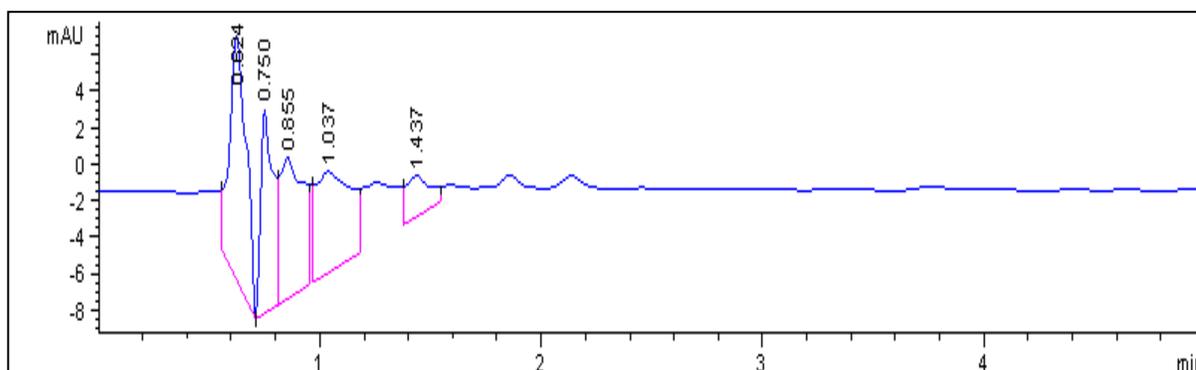
Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 65. Cromatograma del grupo experimental extracto de tejocote a 100 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 9.87 correspondiente al pico del MDA.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 66. Cromatograma del grupo experimental extracto de tejocote a 1000 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 9.01 correspondiente al pico del MDA.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Posteriormente se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde y = absorbancia, $b= 35.051$, $m= 89.209$.

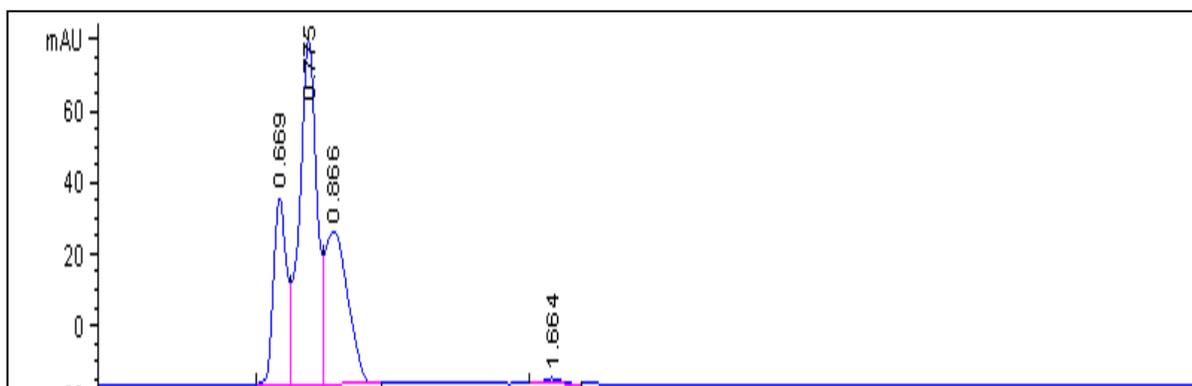
Grupo experimental	1ra inyección (μg de MDA)	2da inyección (μg de MDA)	Promedio (μg de MDA)
DIA 7			
PBS	2,71	3,94	4,87
FeSO4	8,49	7,86	6,18
Extracto de manzana (eritrocitos + oxidante + extracto)			
10 ppm	5,10	5,08	5,09
100 ppm	5,76	5,77	5,76
1000 ppm	6,00	5,97	5,98
Extracto de tejocote (eritrocitos + oxidante + extracto)			
10 ppm	4,08	4,07	4,07
100 ppm	3,80	3,81	3,80
1000 ppm	3,16	1,47	2,32

En esta prueba se cuantifico los μg de MDA generados en el día 7 así como corroborar el tiempo de vida del MDA, se inició con las inyecciones del grupo blanco y control y se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde $y=$ absorbancia, $b= 35.051$, $m= 89.209$. El grupo blanco con 7 días de incubación genero 4.87 μg de MDA, en cambio, el grupo control genero 6.18 μg de MDA. En cuanto a la comparación del grupo control y el extracto de manzana, el MDA producido fue menor, sin embargo no fue tan efectiva la protección antioxidante del extracto. Se esperaba que conforme aumentara la concentración del extracto aumentará la inhibición de la producción de MDA

En cuanto a la comparación del grupo control y el extracto de tejocote, la protección fue mayor; se generó en la concentración de 100 ppm solo 3,80 μg de MDA, esto fue menor incluso que el grupo blanco.

Posteriormente se decidió inyectar un control interno (STOCK de MDA) para descartar la posibilidad de que los metabolitos de los extractos estén interviniendo con el pico del MDA. Solo se muestra un ejemplo de la inyección para comprobar que al inyectar el MDA el pico de absorción máxima de este componente aumenta el tamaño del área.

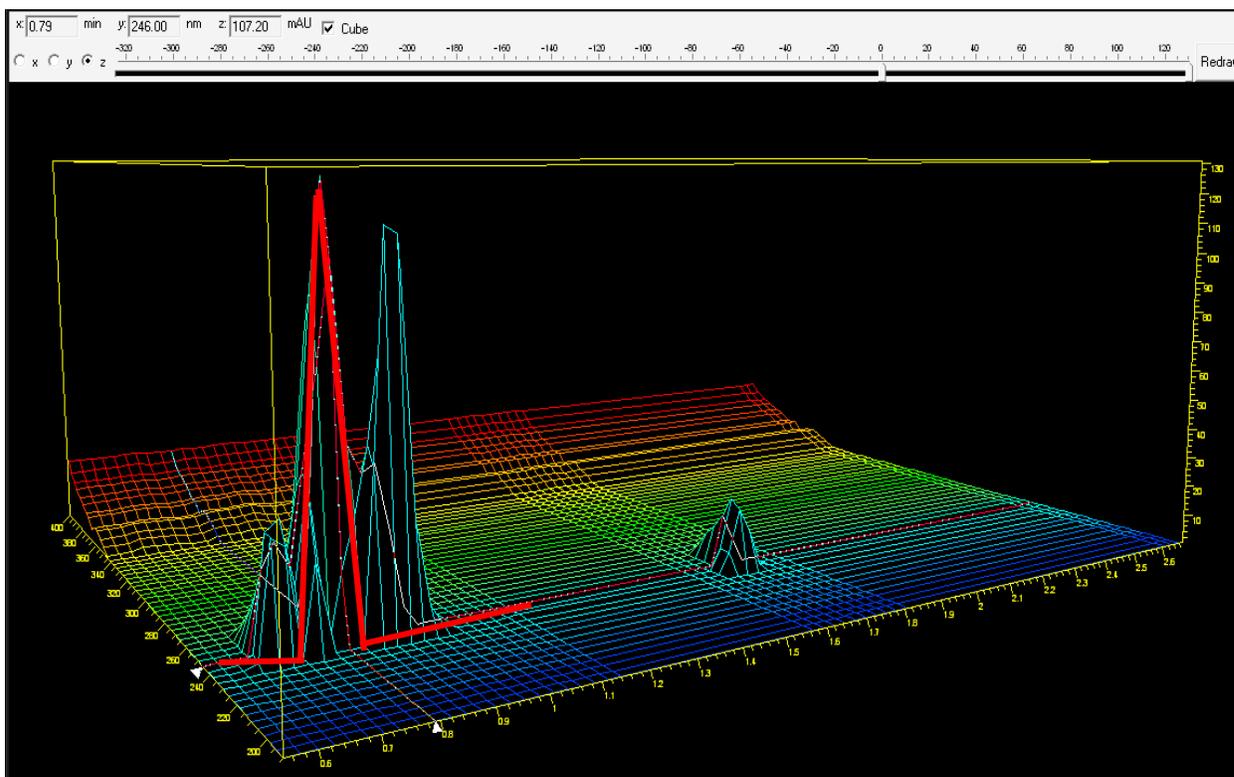
Figura 67. Cromatograma del grupo experimental extracto de manzana a 10 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.75 un área (mAU) de 11.24 correspondiente al pico del MDA.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

En un tubo nuevo se tomó una alícuota del grupo experimental 10 ppm de manzana y se agregó MDA para corroborar que aumenta el área del pico.

Figura 68. Espectro del grupo experimental extracto de manzana a 10 ppm, con un tiempo de incubación de 7 días. Se determinó al minuto: 0.79 un área (mAU) de 107.20



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

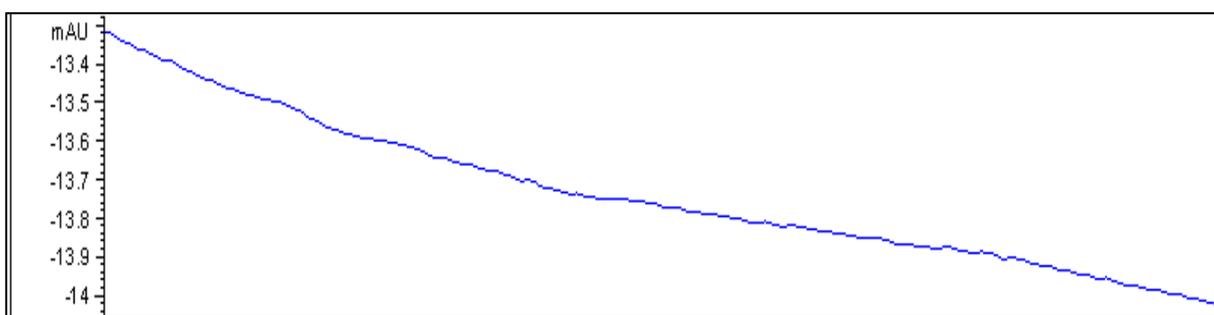
Se observa en la figura 67, el área generada por el extracto en un tiempo de incubación de 2 horas, posteriormente en un nuevo tubo se adiciono MDA previamente preparado. En la figura 68, se observa el espectro dónde se detecta el pico del MDA y el área que genera es de 107.20. Con esto se corrobora la generación del MDA y su pico de absorción.

PRUEBA 4

Por último se corrobora que el MDA tiene un tiempo de vida máximo de 8 días, por lo cual no puede ser cuantificado después de este tiempo.

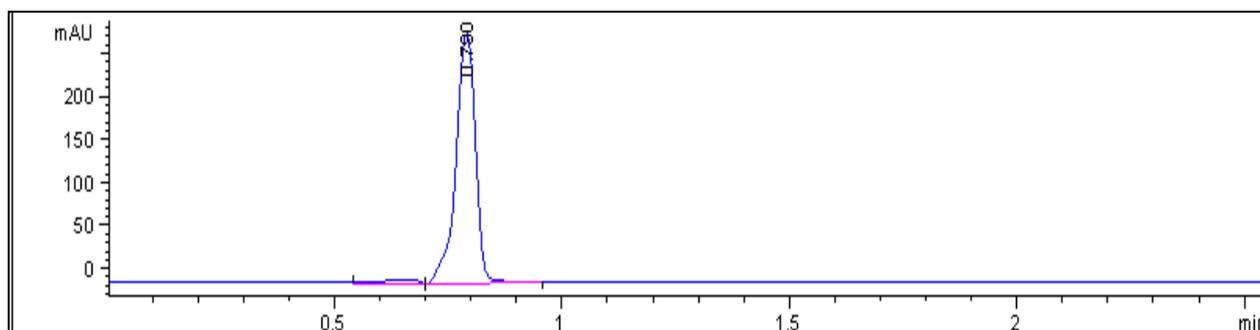
Para realizar esta prueba se tomó una alícuota de la muestra del grupo blanco (PBS + eritrocitos) la cual tenía transcurridos los 10 días de incubación. Se inyectó en el HPLC y se obtuvo el siguiente cromatograma.

Figura 69. Cromatograma del grupo blanco con un tiempo de incubación de 10 días.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Figura 70. Cromatograma del grupo blanco + MDA, con un tiempo de incubación de 10 días.



Fuente: Análisis en el laboratorio de química de la nutrición de la licenciatura en nutrición, facultad de ciencias de la salud, de la universidad autónoma de Tlaxcala, 2013-2015.

Al inyectar nuevamente se muestra que el pico del MDA se genera, esto se observa en la figura 70. Demostrando que el MDA es un compuesto inestable en solución y que no es posible cuantificarlo después de 10 días.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

El tejocote *Catragus mexicana* es una fuente natural de antioxidantes polifenólicos, tienen la capacidad de inhibir el estrés oxidativo provocado por el sulfato ferroso en un 50%. Esto se demostró en un estudio realizado en el 2013; en el cual se evaluó mediante diferentes técnicas colorimétricas la actividad antioxidante del fruto reportando los siguientes valores de la IC₅₀; el extracto de acetona fue el más activo, con un valor de IC₅₀ (valor que indica la concentración necesaria para inhibir una función biológica o bioquímica en un 50%) de 15.2 mg / L, para DPPH y TBARS de 17.7 mg / L, se observó una alta correlación entre los resultados de TBARS y DPPH. Estos resultados demuestran el potencial de valor nutritivo y antioxidante de esta fruta mexicana (**Méndez-Iturbide D., y cols 2013**)

También se han realizado estudios de manzana californiana (*Malus domestica*) en plasma sanguíneo; los cuales reportan que a 10 y 50 ppm existe una inhibición mayor al 50 %. En cuanto a resultados de técnicas como DPPH, se reporta una actividad antioxidante mayor al 70 %.

En el laboratorio se trabajó con geles de tipo SDS-PAGE aniónico, con una concentración de 10% esto permitirá una separación mayor de las proteínas. En 2001 se publicó un artículo llamado *Electrophoresis in practice* (electroforesis en práctica), en el cual expone los diferentes tipos de electroforesis, así como, las ventajas de cada una de ellas (**Westermeier R. 2001**).

Inicialmente se trabajó con pruebas a 5, 10, 50, 100, 500, 1000 y 1400 ppm de extracto de frutos, utilizando también eritrocitos inducidos con FeSO₄ como método *in vitro*, con la finalidad de identificar la cantidad mínima de extracto que se necesita para inhibir la oxidación de proteínas. Para este estudio se utilizó (como guía para la identificación de proteínas) un marcador de peso molecular en todos los geles de los dos extractos; se esperaba que conforme pasaran los días las proteínas que más se afectaran son las que solo tienen el FeSO₄, también se

esperaba que el efecto anti radical aumentara conforme aumentaba la concentración de extracto por lo tanto, a concentraciones menores del extracto mayor cantidad de radicales libres provocando mayor daño a las proteínas. Se esperaba observar un mayor daño en el grupo que solo contiene el oxidante, sin embargo no se obtuvieron resultados favorables; no se logró observar el daño a diferencia del grupo blanco.

En cuanto a la prueba de inhibición de hemólisis realizada en los tubos eppendorf y la prueba de los extendidos citológicos; los resultados son congruentes, donde se observó que a partir del séptimo día (figuras 12) los tubos sufrieron una hemólisis uniforme en todas las concentraciones. Se observa claramente una baja protección antioxidante del extracto de manzana sobre los eritrocitos. Se puede observar en las fotos tomadas de los extendidos citológicos los eritrocitos cambian su forma, por lo tanto, su función a partir del día siete. Conforme pasan los días se observa un daño mayor en los eritrocitos.

En cuanto a los resultados de tejocote los aspectos que se puede observar que la concentración de 100 ppm es la que más conserva la morfología de los eritrocitos, se observa también una menor hemólisis en los tubos de concentraciones mayores a 100 ppm pero al observar los extendidos citológicos la presencia de eritrocitos es mínima y la morfología cambio completamente. Se puede concluir que juega un doble papel el extracto de tejocote y causa un daño severo en la membrana celular del eritrocito por lo cual no permite la liberación de hemoglobina. **Casadevall V. en 2009** menciona el doble papel que desempeñan los flavonoides como antioxidantes/prooxidantes, algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa, por esta razón se atribuye por qué las bandas con mayor concentración son afectas y no protegidas por el extracto.

Se realizó nuevamente la prueba de electroforesis con el fin de demostrar la reproducibilidad entre el grupo blanco y el grupo control, en esta prueba se pretende encontrar un mayor daño en el grupo del oxidante; así mismo, diferenciar entre la protección que brindan los extractos a los eritrocitos. Se realizó bajo las mismas condiciones y se probaron solo las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm de ambos extractos. El gel se preparó al 10% de acrilamida. La concentración de trabajo fue de 134 μ g de proteína (método de Lowry). En el mismo gel se probaron los dos extractos con las mismas concentraciones, se observa la presencia de diferentes proteínas como ankirina, proteína banda 3, glicoforina, banda 4.1.

Trascurridos 7 días de incubación se observa en el gel de electroforesis (figura 37) la presencia de proteínas como banda 3 en el grupo blanco, la proteína glicoforina se observa en el grupo blanco y en el grupo que contienen el extracto de tejocote. En cuanto al extracto de manzana se observa la nula protección de oxidación en las proteínas; el extracto de tejocote se comportó de diferente manera, se observa la presencia de proteínas en la concentración de 100 ppm. Nuestros resultados son consistentes con los de hallazgos anteriores en los eritrocitos sometidos a estrés oxidativo como reporta **Singh y Rajini 2008**, al utilizar extracto de papa, rico en polifenoles para inhibir el efecto oxidativo de H_2O_2 en la membrana del eritrocito. Reportan que el H_2O_2 indujo alteraciones morfológicas en la membrana celular y actúa sobre la porción intracelular mediante la interacción con la hemoglobina iniciando una serie de reacciones provocando lisis en el eritrocito. Los oxidantes son utilizados como inductores de alteraciones en la membrana de los eritrocitos y las propiedades reológicas.

También se hizo la repetición de la prueba de inhibición de hemolisis con el fin de cuantificar la cantidad de hemoglobina liberada y así correlacionar con el daño que sufren los eritrocitos. Se cuantifico la cantidad de hemoglobina liberada durante 7 días, se obtuvieron resultados congruentes; a las 2 horas de incubación se cuantifico la hemoglobina encontrando resultados como 0.001 ± 0.000 , en el grupo blanco y 0.006 ± 0.001 en el grupo control. Los resultados del extracto no fueron significativos; transcurridos 7 días se cuantifico nuevamente la hemoglobina, en el grupo blanco se obtuvo 0.337 ± 0.003 y en el grupo control $0.372 \pm$

0.003; en cuanto al extracto de manzana reporto una absorbancia a 10 ppm de 0.301 ± 0.002 , a 100 ppm de 0.311 ± 0.002 y a 1000 ppm de 0.319 ± 0.001 . Esto demuestra que el efecto antioxidante de la manzana es bajo por lo cual no protege de manera significativa a los eritrocitos y la hemoglobina se libera. En cuanto al extracto de tejocote se obtuvo una absorbancia en la concentración de 10 ppm de 0.271 ± 0.002 , en 100 ppm de 0.263 ± 0.002 y a 1000 ppm de 0.227 ± 0.003 ; se observa una protección del extracto sobre los eritrocitos por lo cual retarda el proceso de hemolisis de los eritrocitos.

Respecto a la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño) se utilizó para cuantificar las concentraciones de MDA producidas durante un período de 28 días. Se inicio generando una curva de calibración de MDA con una concentración de 0 a 10 μg MDA/mL. Se realizaron diferentes disoluciones para generar la curva de calibración del MDA, las disoluciones fueron 2, 4, 6, 8 y 10 μg de MDA/mL. Posteriormente con el arreglo de diodos se logró identificar el pico máximo de absorción del MDA que sirvió como guía para identificar el área que genera este compuesto así como el minuto en el cual se identificaría, este resultado se observa en la figura 44. La longitud de onda fue de 242 nm, reportando al minuto 0.80 un área de 482.71 mAU. Con las condiciones experimentales ya establecidas se inyecto por duplicado las muestras de cada extracto a concentración de 10, 100 y 1000 ppm; para identificar los picos de los metabolitos y poder diferenciar entre el pico del MDA y los picos propios de cada extracto y de cada concentración. En la figura 45, 46 y 47 se observan los picos correspondientes de cada concentración del extracto de manzana, en las figuras 48, 49 y 50 se observan los picos correspondientes del extracto de tejocote.

Siguiendo con la prueba se inyecto el grupo blanco y control para identificar el daño que el oxidante ocasiono en los eritrocitos y contabilizar la cantidad de MDA liberado en un tiempo de incubación de 2 horas. Posteriormente se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde y = absorbancia, b (intersección)= 35.051, m (pendiente)= 89.209.

El grupo blanco con 2 horas de incubación genero 0,77 μg de MDA, el grupo control genero 1,64 μg de MDA. A pesar de que el aumento de MDA no es significativo aun, se observa un incremento en la producción.

La prueba siguiente que se realizo fue inyectar el extracto a 10, 100 y 1000 ppm de ambos frutos, estos tubos también contenían eritrocitos. Con esta prueba se descartó el posible daño que el extracto pudiera ocasionar en los eritrocitos. Se observó que el área bajo la curva no aumento, por lo que no fue necesario calcular la concentración de MDA. En cuanto al extracto de tejocote se observó la misma tendencia; no aumento significativamente el área bajo la curva, por lo cual se descarta la posibilidad de que el extracto por si solo genere algún daño.

En la siguiente prueba se cuantifico los μg de MDA generados en el día 7 así como corroborar el tiempo de vida del MDA, se inicia con las inyecciones del grupo blanco y control y se calculó la concentración de MDA generado en cada grupo, utilizando la fórmula de $x=(y-b)/m$, donde y = absorbancia, $b= 35.051$, $m= 89.209$. El grupo blanco con 7 días de incubación genero 4.87 μg de MDA, en cambio, el grupo control genero 6.18 μg de MDA. En cuanto a la comparación del grupo control y el extracto de manzana, el MDA producido fue menor, sin embargo no fue tan efectiva la protección antioxidante del extracto. Se esperaba que conforme aumentara la concentración del extracto aumentará la inhibición de la producción de MDA, sin embargo, se obtuvieron resultados diferentes pero que son congruentes con el estudio de evaluación de la inhibición de lipoperoxidación en plasma sanguíneo por extractos de epidermis de manzana realizada por la prueba de TBARs (**Rodríguez T. 2013**). Donde se observa que al aumentar la concentración de 50 ppm disminuye su efecto protector frente a los lípidos de la membrana celular del eritrocito.

En cuanto a la comparación del grupo control y el extracto de tejocote, la protección fue mayor; se generó en la concentración de 100 ppm solo 3,81 μg de MDA, esto fue menor incluso que el grupo blanco. Se espera que conforme aumente la concentración del extracto aumente la inhibición de la producción de MDA, sin embargo, se obtuvieron resultados diferentes pero que son congruentes con el estudio de evaluación de la inhibición de lipoperoxidación en eritrocitos humanos por extractos de epidermis de tejocote realizada por la

prueba de TBARs (**Grada S. 2013**). Donde se observa que al aumentar la concentración de 100 ppm disminuye su efecto protector frente a los lípidos de la membrana celular del eritrocito. Se ha demostrado que una concentración de 1000 ppm protege la membrana celular del eritrocito por lo cual no permite la liberación de hemoglobina (hemolisis); sin embargo, el eritrocito sufre daño y cambia su morfología.

Posteriormente se decidió inyectar un control interno (STOCK de MDA) para descartar la posibilidad de que los metabolitos de los extractos estén interviniendo con el pico del MDA; se observó el aumento en el pico correspondiente al MDA.

Para la prueba final se decide corroborar que el MDA tiene un tiempo de vida máximo de 8 días, por lo cual no puede ser cuantificado después de este tiempo. Para realizar esta prueba se tomó una alícuota de la muestra del grupo blanco (PBS + eritrocitos) la cual tenía transcurridos los 10 días de incubación, se observó que no se detecta ningún pico, por lo que se decidió preparar nuevamente el MDA y agregarle al tubo una alícuota. Al inyectar nuevamente se muestra que el pico del MDA se genera; demostrando que el MDA es un compuesto inestable en solución y que no es posible cuantificarlo después de 10 días (figura 69,70).

9. CONCLUSIONES

El extracto de manzana presenta una baja protección antioxidante, se puede observar que a partir del séptimo día no existe una protección de la membrana celular del eritrocito, por lo que, no retarda el proceso de hemólisis trayendo como consecuencia la oxidación de las proteínas de la membrana celular. Esto se pudo corroborar al realizar los extendidos histológicos, encontrando que la membrana celular sufrió un daño por completo a partir del séptimo día en todas las concentraciones.

En cuanto a los resultados de los extractos de tejocote se observa que mostraron mayor inhibición de oxidación de proteínas, la concentración que reportaron mayor inhibición a 100 ppm, considerando también que a mayor concentración la actividad antioxidante no resulta beneficiosa si no tóxica para el modelo que se está trabajando. Estos resultados se pueden observar no solo en los diferentes geles sino también en el proceso de la prueba de inhibición de hemólisis realizada en los tubos eppendorf y cuantificada espectrofotométricamente; en la concentración de 100 ppm se obtuvo una menor absorbancia en comparación con las demás concentraciones. En cuanto a los extendidos citológicos se puede observar mayor conservación en esta concentración a diferencia de las demás. Con esto se puede concluir que la concentración óptima de trabajo para eritrocitos es 100 ppm. También se puede observar que los resultados son congruentes en las tres metodologías (electroforesis, extendidos citológicos, cuantificación de hemoglobina) utilizadas en el proyecto para ambos frutos.

En la prueba de HPLC se observó que la concentración que inhibe en mayor proporción la formación de MDA fue la 10 y 100 ppm del extracto de tejocote, también se observó que el MDA como compuesto es muy inestable en solución y no puede ser cuantificado a partir del día 10 en eritrocitos. Se corrobora que el extracto de tejocote no funciona como prooxidante para el modelo de eritrocitos; no supera el daño producido en la membrana celular del eritrocito y por consiguiente la producción de MDA es menor en comparación con el grupo control.

Se corroboran los estudios previamente realizados por la técnica de TBARs; demostrando la efectividad de los extractos en concentraciones menores a 100 ppm. También se descarta la posibilidad de la interferencia de la hemoglobina con el cromoforo formado (MDA-TBA), en la lipoperoxidación de eritrocitos humanos *in vitro*.

Para finalizar se demostró mediante electroforesis, extendidos citológicos, cuantificación de hemoglobina y HPLC que la concentración de 1000 ppm del extracto de tejocote ejerce un efecto de oxidante en la morfología del eritrocito, sin embargo, la membrana celular no se dañó por lo cual no permite la liberación de hemoglobina. Se infiere que el daño es muy severo y la membrana muestra una rigidez que no permite el funcionamiento normal de los eritrocitos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fang Y, Yang S, Wu G. **2002**. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* 18:(10)872– 879.
2. Céspedes L., Mohammed E., Pavon N., Alarcon J. **2008**. Antioxidant and cardioprotective activities of 1q extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia*. *Food Chemistry* 107 (2) 15, 820-829.
3. Buddi R, Lin B, Atilano S, Zorapapel N, Kenney M, Brown D. **2002**. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J. Histochem. Cytochem.* 50(3): 341–51.
4. Uttara B., Ajay S., Zamboni P., Mahajann R. **2009**. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 7 (1).
5. Maldonado O, Jiménez E, Guapillo M, Ceballos G, Méndez E. **2010**. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica UV*. Centro de investigaciones biomédicas.
6. Méndez-Iturbide D, Banderas-Tarabay JA, Nieto-Camacho A, Rojas-Chávez A, García-Meza MG. **2013**. Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. *Afr. J. Food Sci.* 7, 150-158.
7. Lien P. **2008**. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 4 (2) 89-94.
8. Cárdenas N, Pedraza J. **2006**. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*. Vol. 17(2): pp 164-173.
9. Loh K., Huang S., De Silva R., Tan B., Zhu Y. **2006**. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Curr Alzheimer Res.* 3(4),327-37.
10. Martínez M. **1998**. Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals, *Granada University, España*, 39:1;5-18.
11. Kodja G, Harrison D. **1999**. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.*; 43:562-71.
12. Tsimikas S. **2009**. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 98, 9-17.
13. Turrens F. **2011**. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal Physiology.* 552(2), 335-344.

14. Lien A, Hua H, Chuong P. **2008**. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4(2): 89-95
15. Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C, Mueller M, Drexler H. **2007**. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:943-948.
16. Takeshita K, Chi C, Hirata H, Ono M, Ozawa T. **2006**. In vivo generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radical Biology & Medicine*. 40: 876 – 885.
17. Trakya University. **2007**. Free radicals: our enemies or friends. *Advances in Molecular Biology* (1): 63-69.
18. Stadtman E., Oliver C. **1991**. Metal-catalyzed oxidation of proteins: Physiological consequences. *J.Biol.Chem.* 266: 2005-2008.
19. Requena J., Levine R., Stadtman E. **2003**. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids* 25: 221-226.
20. Raza H., John A. **2007**. In vitro protection of reactive oxygen species-induced degradation of lipids, proteins and 2-deoxyribose by tea catechins. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1814–1820.
21. Cheng Z, Li Y. **2007**. What is responsive for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: *An update. Chem. Rev.* 107: 748-746.
22. Lozada I., Zepeda C., Verdejo I., Romero E., Escudero G., Cortés S., Enríquez E., Rivera M., Hernández S., Gutiérrez J. **2011**. Producción de lipoperóxidos y nitratos totales en concentrados plaquetarios: estudio piloto. *Rev Mex Med Tran.* 4, 126.
23. Dalle-Donnea I., Rossib R., Giustarinib D., Milzania A., Colombo R. **2003**. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 329, 23–38.
24. Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. **2010**. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine.* 7(5): 36-44.
25. Laemmli UK. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-688.
26. Fairbanks G, Steck T, Wallach D. **1971**. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606-2617.

27. Estepa, V.; Ródenas, S.; Martín M.C. **2001**. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm.* 67, 2-17.
28. Cañas P, Olivares M, Celedon C, Llaguno S, Velenzulea A. **1988**. Actividad del sistema de defensa antioxidante y agresión oxidativa en eritrocitos de recién nacidos de bajo peso y distintas edades gestacionales. *Rev Chil Pediatr* 59(2): 83-88.
29. Geneser F. **2001**. Sangre en: histología, *Médica Panamericana*. (3). 235-256.
30. Buddi R, Lin B, Atilano S, Zorapapel N, Kenney M, Brown D. **2002**. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J. Histochem. Cytochem.* 50(3): 341-51.
31. Dupire J, Socol M, Viallat A. **2012**. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *PNAS*; 109(51): 20808-20813.
32. Costanzo L, 2000. Fisiología. 1ª ed. Méjico: McGraw-Hill Interamericana.
33. Gunalan K, Gao X, Liew K, Preiser P. **2011**. Differences in erythrocyte receptors specificity of diffrents parts of the Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homologue 2A. *Infection and Immunity*. 79(8): 3421- 3430
34. Mackenzie S. **2000**. El eritrocito. En: Hematología Clínica, Segunda ed. Ed. El Manual Moderno (México): 39-60.
35. Cimen M. **2008**. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chem Acta* 390: 1-11.
36. Mayor R. **2010**. Estrés oxidativo y sistema de defense antioxidante. *Rev. Instituto de Medicina Tropical*; 5(2):23-29.
37. Middleton I, Kandaswami C., Theoharides C. **2000**. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52(4): 673-751.
38. Geronikaki A., Gavalas A. **2006**. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 425- 442.
39. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. **2004**. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*; 74: 2157-2184.

40. Delgado C., Hena R., Morales F. **2005**. Assessing the Antioxidant Activity of Melanoidins from Coffee Brews by Different Antioxidant Methods. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7832- 7836.
41. Muller Y. **2006**. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med* 40: 1993-2004.
42. Devasagayam T. **2009**. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India.*52: 794-804.
43. Franco-Mora O, Aguirre-Ortega S, Morales-Rosales EJ, González-Huerta A, Gutiérrez-Rodríguez F. **2010**. Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana* DC) de Lerma y Ocoyoacac, México. *CIENCIA Ergo Sum.* 17(1): 61-66.
44. Grada S. **2013**. Inhibición de lipoperoxidación por el método TBARS en eritrocitos humanos por extractos de tejocote in vitro. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Tlaxcala.
45. Rodríguez T. **2013**. Inhibición de lipoperoxidación por el método TBARS en plasma sanguíneo por extractos de manzana in vitro. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Tlaxcala
46. Rodríguez S, Visentin A, Maestri D, Cocero M. **2012**. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green. *Journal of Food Engineering.* 109: 98–103.
47. Hseu Y., Chang W., Chen C., Liao J., Huang C., Lu F., Chia Y., Hsu H., Wu J., Yang H. **2008**. Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem. Toxi.* 46, 105-114.
48. Torres-Oquendo JD, Caballero-Santos B, Burgos JS, Fernández-Ginés JM. **2011**. Análisis del aprovechamiento de subproducto del mango (*Magnifera indica* L.) para la obtención de compuestos farmacológicos y nutricionales. *Alimentaria.* Octubre 417: 95-98.
49. Westermeier R. **2001**. Electrophoresis in practice. *Wiley VCH.* (3).
50. Casadevall V. **2009**. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales: citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis.
51. Singh N, Rajini PS. **2008**. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions.* 173: 97-104

52. Torres-Oquendo JD, Caballero-Santos B, Burgos JS, Fernández-Ginés JM. 2011. Análisis del aprovechamiento de subproducto del mango (*Magnifera indica* L.) para la obtención de compuestos farmacológicos y nutricionales. *Alimentaria*. Octubre 417: 95-98.
53. Valero MA, Vidal A, Burgos R, Calvo FL, Martínez C, Luengo LM, Cuerda C. **2011**. Meta-análisis del papel del licopeno en la diabetes mellitus tipo 2. *Nutr Hosp*. 26(6):1236-1241.
54. Estepa V, Ródenas S, Martín MC. **2001**. Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. farm.* April; 67(3): 1-16.
55. Coimbra S, Castro E, Santos-Silva A. **2006**. Disminución de estrés oxidativo en relación con el consumo de té verde. *Clinical Nutrición*. 25(5): 790-796.
56. Nieto-Ángel R. **2007**. Colección, conservación y caracterización del tejocote (*Crataegus* spp). En: AR Nieto (Ed). *Frutales nativos, un recurso filogenético en México*. UACH. México.
57. Nuñez-Colín CA, Hernández-Martínez MA. **2011**. La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp) en México. *Rev. Mex. Cienc. Agric.*2 (1): 141-153.
58. López-Santiago J, Nieto-Ángel R, Barrientos-Priego AF, Rodríguez-Pérez E, Colinas-León MT, Borys MW, González-Andrés F. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.) *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2): 97-111.*
59. Cervantes-Cardoza, V. **2011**. Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh-Rosaceae-). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(6).
60. Rodríguez R. , Hernández A., Zermeno A., Jasso D. **2006**. Caracterización del manzano *malus domestica*. *Agrociencia*, ISSN-e 1405-3195, 40 (5) 577-584.
61. Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., & Drilleau, J. F. **1998**. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1698-1705.
62. Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., y Drilleau, JF **1999**. Perfiles de polifenoles de las variedades de manzana de sidra francesa (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (12), 4847-4853.

63. Russell J. **1967**. Notification of final adaption of an international method and standard Solution for hemoglobinome try specifications for preparation of standard solution. *Am. J. Chino Path* 47 (2), 212-213.
64. Melendez A., Vicario I., Heredia F., **2007**. Pigmentos caroteniodes: consderaciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos latinoamericanos de nutrición. Órgano oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición.* 57 (2), 109-117.
65. Escamilla C., Cuevas E., Guevara J. **2009**. Flavonoides y su acción antioxidante. *Rev Fac Med UNAM.* 52 (2), 73-75.

11. ANEXOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

DR. J. JUSTO VÁZQUEZ HERNÁNDEZ
COMISIONADO ESTATAL DE LA COEPRIST

ASUNTO: PERMISO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTE

Anticipándole un respetuoso saludo, y en atención a la Secretaría de Salud de Tlaxcala, a través de este conducto solicito bajo su amable consideración, el aval del COEPRIS para obtener por venopunción 8 mL. de muestras de sangre de 30 estudiantes sanos, quienes participaran de manera voluntaria en el proyecto de investigación titulado "VALORACIÓN DE EXTRACTOS DE TEJOCOTE (*Cratogeomys mexicana*) EN LA INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN ERITROCITOS HUMANOS: ESTUDIO *IN VITRO*", el cual fue autorizado previamente por el comité de bioética de la Escuela de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, siguiendo los lineamientos del reglamento de investigación de la UAT y del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, respetando los artículos 1°, 3°, 6°, 9°, 10°, 14 Fracc. II, III, V, VI, 17 Fracc. I, 20, 21, 22, 23, 57, 58 Fracc. I, III, 67, 99, 99 Fracc. I, III, 102, 109, 111, 114, 115 y 116 Fracc. I, II, III, IV, V, VI, VII.

El proyecto mencionado no pone en riesgo la integridad física o mental de los voluntarios y los cuales han autorizado bajo consentimiento informado, realizar por una sola vez dicho procedimiento. La autorización solicitada y visto bueno por parte de la COEPRIS, es para cubrir los requisitos institucionales e iniciar un proyecto de investigación de Doctorado en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Tlaxcala, en el área de Biomedicina, con riesgo mínimo que involucre colección de muestras humanas. Se anexa el protocolo de investigación de dicho proyecto y los documentos de solicitud para iniciar los trámites correspondientes ante la comisión que Ud. dignamente dirige.

Agradeciéndole su amable atención, se extiende la presente, en la ciudad de Tlaxcala de Xicohténcatl a los 2 días del mes de Julio del año dos mil doce. Quedo de Ud. en espera de su amable respuesta.

ATENTAMENTE

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"


DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE
DIRECTOR DEL PROYECTO



c.c.p. Dra. Margarita Martínez. Directora del CTBC, UAT.
c.c.p. Dr. Jorge Rodríguez Antón. Coordinador del posgrado del CTBC, UAT.
c.c.p. Archivo.



Av. Xicohténcatl Norte No. 466 Barrio de San Nicolás. C.P. 90920 Tel y Fax: 01 271 211 2111
Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000