



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas



Valoración del Extracto de Tejocote (*Crataegus mexicana*) en la Inhibición de lipoperoxidación en Eritrocitos Humanos

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta
José Antonio Banderas Tarabay**

Codirectores

Dr. Daniel Méndez Iturbide

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Tlaxcala, Tlaxcala.

Marzo, 2015



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas



Valoración del Extracto de Tejocote (*Crataegus mexicana*) en la Inhibición de lipoperoxidación en Eritrocitos Humanos

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta
José Antonio Banderas Tarabay**

Comité Tutorial

Dr. Daniel Méndez Iturbide
Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Dra. Estela Cuevas Romero
Dr. Arturo Navarro Ocaña

Financiamiento. La presente tesis de investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Alimentos, de la Licenciatura en Nutrición, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Av. Xicohtencatl No. 466, Barrio de San Nicolás, San Pablo del Monte 90920, Tlaxcala, México. Tel/Fax: 01222823917.

El proyecto de investigación fue financiado parcialmente por fondos del CONACYT 105663-2008-DMI. De igual manera, por el apoyo financiero de una beca académica CONACYT-54150-JABT.

Agradecimientos.

El sustentante y el grupo de investigación que participaron para la realización del siguiente proyecto, agradecen al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC, UAT), el apoyo incondicional y la asesoría recibida a quienes participaron en la realización de ésta tesis de investigación.

Al CONACYT, por el apoyo de la beca académica para realizar estudios de posgrado con número CVU-54150.

Al Dr. Daniel Méndez Iturbide, Director de ésta tesis, quien con sus conocimientos siempre estuvo pendiente para llevar a buen fin el presente trabajo.

Al Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Co-Director de ésta tesis, quien supervisó los avances de éste trabajo, aportando sus conocimientos y experiencia en apoyo de la investigación.

A la Dra. Estela Cuevas Romero, un ejemplo de dedicación al trabajo de investigación, y por su apoyo académico y moral en todo momento.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña, investigador del instituto de química la UNAM, quien siempre estuvo pendiente del trabajo realizado en ésta tesis, cuyos consejos invaluable sirvieron para salir adelante en todo momento y llevar a buen fin el presente trabajo de investigación.

A todos ellos, gracias por haberme permitido ser su alumno, brindarme su amistad y compartir su espíritu humano en el ámbito personal y de investigación, con el que siempre me trataron.

Agradecimientos a título personal

Quiero expresar un especial agradecimiento a la Dra. Margarita Martínez Gómez, por brindarme su confianza para ingresar y terminar el Doctorado en Ciencias Biológicas, y sobre todo por su invaluable amistad, ya que siempre estuvo pendiente de todos los aspectos académicos y personales durante mi estancia en el posgrado del CTBC.

Al Dr. Raúl Jiménez Guillen, ya que sin sus atinados consejos, éste proyecto personal no se hubiera logrado, gracias por ese apoyo incondicional desde un principio.

A la Dra. Margarita Cervantes Rodríguez, por el apoyo en el trabajo estadístico, consejera y amiga en todo momento.

A los profesores del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y a los alumnos que participaron como voluntarios para realizar el presente trabajo de investigación y me auxiliaron en el trabajo de laboratorio. A todos los amigos que siguieron conmigo.

A Socorro Romero y a Rebeca Sánchez, por estar siempre pendientes en todos los procesos para terminar el doctorado.

A Yerene Ocomatl, Miriam Grada, Laura Rodríguez y Erika Hernández por su apoyo y amistad invaluable.

Dedicatoria

La tesis está dedicada a mi madre Sara Tarabay de Banderas y a mi padre José Luis Banderas Albarran†, a mis hijas Nicole -donde quiera que estés- y a Sara Irina, a mis hermanos, José Luis, Juan, Jesús, David, Sara, Alfonso, Rafael, Ángeles, e Isabel.

Resumen: Dentro de la gastronomía mexicana, El tejocote *Crataegus mexicana* es una fruta tradicional que se usa para tratar algunas enfermedades y malestares físicos. Estudios han mostrado que extractos de acetona derivados de la cáscara del tejocote (acetona EPT) posee un contenido químico con una fuerte actividad antioxidante en modelos y en sistemas biológicos in vitro, lo que se le atribuye a su contenido de polifenoles. El objetivo de la presente tesis fue determinar la actividad antioxidante del extracto de acetona EPT para proteger a los eritrocitos contra el daño oxidativo in vitro. La actividad antioxidante fué determinada en términos de su efecto contra el daño oxidativo por la técnica de TBARS, los cambios morfológicos por microscopía de luz y el patrón de las bandas por análisis de electroforésis de las proteínas de las células rojas de la sangre (CRS). Se seleccionó el FeSO_4 para inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana celular en CRS humanos y en las proteínas del cito-esqueleto. El contenido total de polifenoles en el extracto de acetona EPT fue de 0.68 ± 0.001 mg/g como el equivalente de ácido galico por gramo. El atrapamiento de DPPH fue calculado por su IC_{50} in 15.26 ± 0.20 mg/L. La mayor inhibición en la formación del TBARS por el extracto de acetona EPT fue de $16.78 + 0.33$ mg/L. El extracto de acetona EPT retarda las alteraciones morfológicas durante la eriptosis del eritrocito. El patrón de las bandas por la técnica de electroforésis mostró que algunas proteínas no se alteran cuando son incubadas durante largos periodos en el extracto de acetona EPT. Además se encontró que el extracto de acetona EPT ofrece una protección significativa a la membrana del eritrocito contra el daño oxidativo hasta por 28 días. En conclusión, el extracto de acetona EPT es capaz de proteger a los eritrocitos contra el daño oxidativo y los cambios morfológicos, actuando como un fuerte antioxidante.

ÍNDICE

	página
I. INTRODUCCIÓN	1
1. ESTRÉS OXIDATIVO	3
1.i. Radicales libres	4
1.ii. Especies reactivas de oxígeno	5
2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES METABÓLICAS	5
3. MECANISMOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DAÑO CELULAR	6
3.i. Mecanismos de defensa antioxidantes en la célula contra especies reactivas de oxígeno	7
4. LIPOPEROXIDACIÓN	9
4.i. Fuentes de hierro (Fe) en la lipoperoxidación	12
4.ii. Productos finales derivados de la lipoperoxidación	13
4.iii. Malondialdehído	14
5. EL ERITROCITO	16
5.i. Embriología del Eritrocito	16
5.ii. Fisiología y Morfología del Eritrocito	18
5.iii. Composición molecular de la membrana del eritrocito	18
a. Metabolismo del eritrocito	23
5.iv. Hemocaterésis o Eriptosis, la apoptosis del eritrocito	23
5.v. Mecanismos moleculares involucrados en la eriptosis	25
5.vi. Mecanismos moleculares involucrados en la oxidación de proteínas por los radicales libres	27
5.vii. Porcentaje del volumen de CRS (Hematocrito o FVE)	29
5.viii. Hemoglobina	29
6. MECANISMOS OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES DE LA SANGRE Y EN EL ERITROCITO	30
7. MÉTODO PARA EVALUAR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ORGANISMO	32
7.i. Técnica de TBARS	32
8. ANTIOXIDANTES NATURALES	33
8.1. Efectos de los antioxidantes en el organismo.	34
8.2. Flavonoides: Polifenoles	35

8.2.i.	<i>Estructura molecular</i>	35
8.2.ii.	<i>Estructura-Función de los flavonoides</i>	38
8.2.iii.	<i>Inhibición de la lipoperoxidación por acción de los flavonoides</i>	39
8.2.iv.	<i>Inhibición de la lipoperoxidación en la membrana del Eritrocito</i>	40
II.	ANTECEDENTES	
1.	EL TEJOCOTE (<i>Crataegus mexicana</i>) COMO ANTIOXIDANTE.	41
II.1.	<i>Origen</i>	42
II.2.	<i>Clasificación taxonómica</i>	43
II.3.	<i>Etnobotánica. Usos y aplicaciones del tejocote en enfermedades.</i>	43
II.4.	<i>Composición fitoquímica</i>	45
II.1.4.i.	<i>Carotenoides</i>	48
II.1.4.ii.	<i>Polifenoles</i>	49
II.1.4.iii.	<i>Datos del laboratorio de Nutrición de la UAT</i>	49
III.	JUSTIFICACIÓN	50
IV.	HIPÓTESIS	51
V.	OBJETIVOS	51
V.1.	Objetivo General	
V.2.	Objetivos Específicos	
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	52
VI.1.	Material.	52
VI.2.	Métodos.	53
VI.2.i.	<i>Obtención de los frutos de tejocote</i>	53
VI.2.ii.	<i>Obtención de la epidermis de tejocote</i>	53
VI.2.iii.	<i>Preparación de los extractos de tejocote</i>	54
VI.2.iv.	<i>Análisis de la reducción de la actividad oxidante con DPPH</i>	54

VI.2.v. <i>Determinación de compuestos fenólicos totales</i>	54
VI.2.vi. <i>Selección de los sujetos y examen clínico</i>	55
VI.2.vii. <i>Obtención de las muestras de sangre</i>	56
VI.2.viii. <i>Manejo y preparación de las muestras de sangre</i>	56
VI.2.ix. <i>Determinación del volumen sanguíneo y hematocrito</i>	57
VI.2.x. <i>Determinación de hemoglobina en sangre</i>	57
VI.2.xi. <i>Cuantificación de proteínas por el método de Lowry</i>	57
VI.2.xii. <i>Preparación de los eritrocitos (CRS) para formar células fantasma (CF)</i>	58
VI.2.xiii. <i>Determinación de la lipoperoxidación en eritrocitos, con la técnica de TBARS</i>	58
VI.2.xiv. <i>Peroxidación lipídica inducida con FeSO₄ en las CRS para realizar el análisis morfológico</i>	59
VI.2.xv. <i>Análisis citológico</i>	60
VI.2.xvi. <i>Determinación de la morfología del eritrocito</i>	60
VI.2.xvii. <i>Dinámica de flujo de las CRS</i>	62
VI.2.xviii. <i>Análisis del eritrocito por electroforesis en geles de SDS-PAGE</i>	62
VI.2.xix. <i>Análisis estadístico de los resultados</i>	63
VII. RESULTADOS	65
VII.1. <i>Obtención de extractos de tejocote</i>	65
VII.2. <i>Cuantificación de compuestos fenólicos totales, DPPH e IC₅₀</i>	65
VII.3. <i>Sujetos de estudio y resultados del análisis de las muestras de sangre.</i>	65
VII.3.a. <i>Promedio de sangre total y volumen globular medio</i>	65
VII.3.b. <i>Determinación del hematocrito</i>	66
VII.3.c. <i>Determinación de la hemoglobina</i>	66
VII.3.d. <i>Cuantificación de proteínas totales</i>	67
VII.4. <i>Determinación de lipoperoxidación por la técnica de TBARS.</i>	67
VII.5. <i>Cuantificación y cambios morfológicos de las CRS y CF.</i>	69
VII.5.a. <i>Cuantificación y cambios morfológicos de los eritrocitos con y sin extracto de acetona EPT</i>	69
1. <i>Normocitos</i>	72
2. <i>Anisocitos</i>	73

3.	<i>Acantocitos</i>	73
4.	<i>Equinocitos</i>	74
5.	<i>Cuerpos de Heinz</i>	74
6.	<i>Esquistocitos</i>	76
VII.6.	<i>Dinámica de flujo, cambios cinéticos y morfológicos de las CRS</i>	76
VII.7.	<i>Análisis del eritrocito por electroforesis en geles de SDS-PAGE</i>	78
VIII.	DISCUSIÓN	82
IX.	CONCLUSIONES	86
X.	PERSPECTIVA	87
XI.	REFERENCIAS	88
XII.	GLOSARIO DE TÉRMINOS	97
	Abreviaciones	
XIII.	ANEXOS	101
	Permisos	
XIV.	PUBLICACIONES Y CONGRESOS PRODUCTOS DEL PROYECTO	105

I. INTRODUCCIÓN

La nutrición es el conjunto de procesos fisiológicos en donde los alimentos ingeridos se transforman y se asimilan, incorporándose al organismo. El deterioro del estado nutricional promueve la aparición de problemas de malnutrición (Mataix, 2009). La malnutrición se asocia a la exposición de oxidantes moleculares que generan especies reactivas de oxígeno (ERO) (Mata y cols., 2008). Las ERO son capaces de producir cambios a nivel celular como es la peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) lo que genera cambios en la fluidez y permeabilidad de las biomembranas, comprometiendo la función de receptores, canales iónicos y proteínas que pueden producir la muerte celular y daño a los tejidos. La LPO se asocia al desarrollo de procesos patológicos y enfermedades crónico-degenerativas, inflamación, daño post-isquémico en perfusiones y transfusiones sanguíneas (Cheng y Li, 2007).

Los antioxidantes presentes en frutas y vegetales comestibles protegen de los efectos del estrés oxidativo. Esto podría ser debido al efecto protector de compuestos antioxidantes específicos o de una acción sinérgica de los diferentes antioxidantes presentes en los alimentos. Algunos antioxidantes presentes en frutas y vegetales son fitatos, flavonoides y carotenoides, así como de las vitaminas A, E y C (Willet, 1994).

El Tejocote (*Crataegus mexicana*) es una fruta tradicional que se utiliza en la gastronomía y herbolaria mexicana. Ésta variedad de tejocote ha sido poco estudiada en relación a sus beneficios clínicos (Arrieta y cols., 2010; Andrade-Cetto y cols., 2005) y solo un estudio se ha reportado en relación a la composición fitoquímica de sus flores (García-Mateos y cols., 2012). Se ha mostrando la presencia de polifenoles como son la quercetina 3-O-glucósido, quercetina 3-O-ramnósido, quercetina 3-O-ramnosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)]-glucósido, y quercetina 3-O-ramnosil-(1→6)-glucósido (rutina), así como la acción antioxidante de extractos con acetona y metanol de la cáscara de tejocote (Méndez y cols., 2013). Sin embargo, se conoce poco sobre cuáles son estos metabolitos, ni la composición de los polifenoles en la cáscara del tejocote *Crataegus mexicana*, tampoco se ha medido su capacidad antioxidante en modelos celulares en seres humanos.

Los eritrocitos son un modelo celular muy utilizado para el estudio de los mecanismos de daño oxidativo y toxicidad en biomembranas, además de ser una muestra fácil de obtener y preparar, representan un modelo celular simple por no contener núcleo ni organelos. Los eritrocitos son susceptibles al estrés oxidativo, debido a su función como transportadores de oxígeno, su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en la membrana, y por contener una elevada concentración de hemoglobina intracelular que pueden actuar como promotores de procesos oxidativos, como es el caso de la lipoperoxidación, lo que conlleva a un daño en la membrana celular, el citoesqueleto y cambios fisiopatológicos en diferentes enfermedades sanguíneas, así como cardiovasculares (Singh y Rajini, 2008), además de la hemólisis.

El estrés oxidativo en las células rojas de la sangre (CRS) induce daños en las proteínas del cito-esqueleto (Dean y cols., 1997), y en los fosfolípidos de la membrana celular (Kowalczyk y cols., 2012), causando de forma directa o indirecta cambios morfológicos y micro-reológicos (Hebbel y cols., 1990), lo que genera una eritrosis prematura (Kempe y cols., 2006; Lang y cols., 2006). Estos cambios están involucrados en la patogénesis de numerosas enfermedades de la sangre, incluyendo diferentes tipos de anemias, desordenes vasculares, cuagulopatías o insuficiencia venosa; también juegan un papel importante en la vida de los eritrocitos en las bolsas de sangre (Baek y cols., 2012). Las ERO también están involucradas en otro tipo de enfermedades crónicas (Kowalczyk y cols., 2012).

La técnica de TBARS (Substancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico) es utilizada para determinar y monitorear la peroxidación lipídica, siendo ésta el mayor indicador de estrés oxidativo. Debido a que hay otras fuentes de malondialdehído, ésta técnica no es completamente específica para la peroxidación de lípidos. Sin embargo, es ampliamente utilizada para determinar y monitorear la actividad de sustancias oxidantes y antioxidante en drogas, productos alimenticios, tejidos biológicos tanto de humanos como de animales (Janero, 1998; Callaway, 1998). Su aplicación en biomedicina es ampliamente utilizado para monitorear diferentes enfermedades en

suero, plasma y células sanguíneas (Villa-Caballero, 2000), así como auxiliar de diagnóstico clínico (Estepa y cols., 2001).

Los tejidos y muestras biológicas contienen productos libres derivados del estrés oxidativo, como los hidroperóxidos lipídicos y aldehídos (como el Malondialdehído [MDA]), que reaccionan con el TBARS formando aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA (Malondialdehído-Ácido Tiobarbitúrico) muy estables, que pueden cuantificarse por espectrofotometría de absorción UV o por fluorometría (Kwon, 1964). En la membrana celular bi-lipídica del eritrocito se puede producir oxidación por las ERO, y la formación del MDA puede ser medido y determinado debido al estado alterado de oxidoreducción de la células (Singh y Rajini, 2008; Bhooshan-Pandey y cols., 2011). Sin embargo, las CRS tienen un sistema anti-oxidante muy efectivo que incluye altos niveles de la enzima catalasa (Cañas y cols., 1988; Aebi y cols., 1968), menor nivel de la super-óxido dismutasa (SOD) (Lynch y cols., 1976), y la glutatión peroxidasa reducida (GPR) (Van Asbeck y cols., 1985), lo que hace que éstas células sean atraparoras móviles de radicales libres.

Se ha demostrado en estudios previos (Méndez y cols., 2013) la capacidad antioxidante del tejocote *Crataegus mexicana*, al inhibir la lipoperoxidación en células de cerebro de rata *in vitro*. Para profundizar en la potencial interacción del eritrocito con los antioxidantes encontrados en frutas mexicanas, el propósito de este trabajo fue valorar, *in vitro*, la capacidad antioxidante de los extractos derivados de la cáscara de tejocote (*Crataegus mexicana*) en la inhibición de la lipoperoxidación y los cambios morfológicos en la membrana del eritrocito humano durante su lapso de vida. La hipótesis de éste estudio es que la peroxidación lipídica en la membrana del eritrocito es inhibida por el extracto de acetona EPT de *Crataegus mexicana*.

1. ESTRÉS OXIDATIVO.

El oxígeno (O₂) es fundamental para el metabolismo y la sobrevivencia de los organismos aeróbicos, sin embargo, en ciertas condiciones se ha asociado con efectos tóxicos de algunos tejidos (Cañas y cols., 1988). De manera habitual el O₂, se

encuentra en su forma más estable con los electrones que forman el enlace (p), antienlazante con el mismo espín, y se le conoce como en estado triplete. Sin embargo, por razones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos), que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular.

En 1956 Harman describe la teoría del estrés oxidativo (Konisberg, 2008). El estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen la pérdida del balance entre radicales libres y los antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, a favor de los radicales libres.

1.i. Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son átomos o grupos de átomos cargados o no, que en su estructura atómica tienen un electrón desapareado o impar en su último orbital, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a sustraer un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electrónica (Se identifican con un punto situado a la derecha del símbolo, ej: H^{\bullet} = radical libre del hidrógeno). Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre y estabilizar su molécula, la molécula estable que se le cedió se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose una reacción en cadena que desestabiliza la organización molecular. (Geronikaki y Gavalas, 2006).

La vida media biológica de un radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que está a su alrededor provocando un gran daño, destruyendo moléculas y membranas celulares. Desde el punto de vista químico, son moléculas que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, produciendo daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Los radicales libres del oxígeno no son deletéreos, nuestro organismo los produce en forma

moderada para combatir bacterias y virus, tienen una función fisiológica en el organismo, como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican las biomembranas y favorecen la quimiotaxis. Existen radicales libres y otras especies no radical, que participan en reacciones que incrementan la concentración de agentes prooxidantes, y se conocen como Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Venereo-Gutiérrez, 2002).

1.ii. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales derivadas del oxígeno que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidas a radicales. Las ERO, juegan un papel importante en la fisiopatología de muchas enfermedades. El estrés oxidativo se refiere a un desequilibrio entre la generación de ERO sobre las defensas naturales, enzimáticas y no enzimáticas, produciendo alteraciones transitorias o definitivas de la relación estructura-función en los niveles de organización celular. Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes se muestran en la **Tabla 1**.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres tenemos a los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantin-oxidasa, la indolamin-dioxigenasa, la triptófano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclo-oxigenasa, la lipo-oxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Venereo-Gutiérrez, 2002).

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES METABÓLICAS

Los trastornos metabólicos y las enfermedades crónico-degenerativas, se han asociado con problemas de estrés oxidativo (Palmieri y cols., 2006). Los tejidos más estudiados son: el sistema nervioso, el sistema vascular, el riñón, páncreas, hígado, la retina y la piel (Buddi y cols., 2002). En estudios clínicos, el estrés oxidativo aumenta con la edad (Salvolini y cols., 2006), en procesos inflamatorios como la artritis (Nagler y cols., 2003), en terapias con radiación ionizante (De la Cal y cols., 2006), y son

responsables de patologías crónicas, incluyendo el cáncer y alteraciones neurodegenerativas (Buddi y cols., 2002), y la hipertensión arterial esencial (HTA) (Touyz, 2005).

Oxidante		Descripción
Anión Superóxido	(O ₂ ^{•-})	Oxígeno con un electrón de más en un orbital. Estado de reducción de un electrón de O ₂ , formado en muchas reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar Fe ²⁺ de proteínas ferrosulfuradas y de la ferritina. Sufre dismutación para formar H ₂ O ₂ espontáneamente o por catálisis enzimática y es un precursor para la formación de HO [•] catalizado por metales. Son producidos por los fagocitos y en reacciones de autoxidación (ciclo redox de las flavoproteínas) y generadas por oxidasas (proteínas heme)
Radical hidróxilo	(HO [•])	Estado de reducción de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Extremadamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares. El radical perhidroxido es una forma protonada de O ₂ ^{•-}
Peróxido de hidrógeno	(H ₂ O ₂)	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de •O ₂ ⁻ o por reducción directa de O ₂ . Soluble en lípidos y por ende capaz de difundirse por membranas. Se amplifica por la presencia de proteínas heme.
Oxígeno singulete	(¹ O ₂)	Oxígeno singulete
Óxido Nítrico	(NO)	Molécula altamente inestable en el aire ya que se oxida rápidamente en presencia de oxígeno convirtiéndose en dióxido de nitrógeno.
Peróxido	(ROO [•])	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Formas lipídicas (LOO) participan en reacciones de peroxidación de lípidos . Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
Alcóxido	(RO [•])	
Hidroperóxido orgánico	(ROOH)	Formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos y nucleobases por pérdida de hidrógenos.
Semiquinona	(Q)	Molécula en estado de semirreducción, que es susceptible a seguir siendo oxidada, como es el caso de algunos flavonoides.
Ozono	(O ₃)	Molécula altamente reactiva capaz de generar radicales libres de diversos átomos como halógenos, nitrógeno, azufre y O ₂ , todo esto catalizado por rayos de alta energía como los UV.
Ácido hipocloroso	(HOCl)	Formado a partir de H ₂ O ₂ por la mieloperoxidasa. Soluble en lípidos y altamente reactivo. Rápidamente oxida constituyentes de proteínas, incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina.
Peroxinitrito	(OONO [•])	Formado en una rápida reacción entre [•] O ₂ ⁻ y NO [•] . Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Su protonación forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión homolítica para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

Tabla 1. Radicales libres derivados de oxígeno.

3. MECANISMOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL DAÑO CELULAR

La disminución intracelular de antioxidantes, en el estrés oxidativo agudo o crónico, o en diferentes tipos de enfermedades como es el síndrome metabólico (Kowalczyk y cols., 2012), incrementa la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el H₂O₂, O₂^{•-} y el [•]OH. Los radicales libres pueden alterar el ADN de las células, proteínas y/o membranas fosfolipídicas y tienen una notable

capacidad para un daño extensivo del sistema fisiológico. Frecuentemente las especies reactivas del oxígeno pueden inducir apoptosis (Daisuke y cols., 2010), siendo un proceso regulado que juega un papel importante en la homeostasis celular (Mata y cols., 2008).

3.i. Mecanismos de defensa antioxidantes en la célula contra especies reactivas de oxígeno

Para contrarrestar los efectos de los radicales libres y por consiguiente de las ERO, las células producen su propio sistema de antioxidantes por medio de diferentes mecanismos que impiden la formación o en su caso neutralizan las ERO una vez que se han formado. Una parte de estas defensas se encuentran en la mitocondria y se clasifican en 5 niveles.

En primer lugar, cuenta con un sistema enzimático capaz de efectuar la reducción tetravalente consecutiva del oxígeno, sin liberar los intermediarios tales como $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 . Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo oxidasa (complejo IV localizado en la membrana interna mitocondrial) responsable de más del 90% de la reducción de oxígeno en el organismo humano.

En segundo lugar se encuentra la enzima especializada superóxido dismutasa (SOD), que es miembro de una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del radical anión superóxido para formar oxígeno y peróxido de hidrógeno. En las células eucarióticas existen tres tipos de enzimas SOD atrapadoras de metales, la mitocondrial que contiene manganeso (Mn^{2+}) en su sitio activo (Mn-SOD), una citoplasmática con un átomo de cobre (Cu^{2+}) y uno de zinc (Zn^{2+}) en su sitio activo (Cu, Zn-SOD) y la tercera es una SOD extracelular.

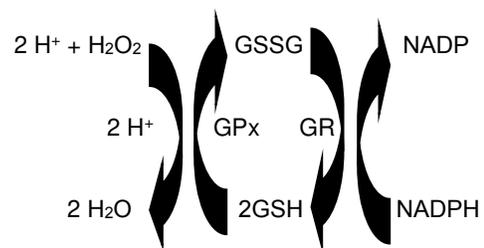


Fig. 1. Reacción antioxidante de glutatión peroxidasa (GPx) a expensas del glutatión reducido (GSH). La GPx reduce el H_2O_2 a H_2O utilizando GSH como donador de electrones y formando glutatión oxidado (GSSG). Finalmente la glutatión reductasa (GR) regenera el GSH utilizando NADPH como donador de electrones.

Un tercer nivel de defensa esta constituido por enzimas, como la catalasa (CAT) que cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O y cuya actividad ha sido descrita en la mitocondria; las peroxidasas (PX), que por diversos donadores de electrones reducen el H_2O_2 . Otra enzima es la glutatión peroxidasa (GPx), que se localiza en el citosol y la mitocondria, cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (**Figura 1**). Acoplada a esta reacción, la glutatión reductasa (GR) reduce al glutatión oxidado (GSSH) utilizando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), impidiendo de esa manera que se agoten las reservas de GSH.

En el cuarto nivel, las ERO pueden ser neutralizadas por sustancias con propiedades antioxidantes, conocidos como atrapadores de radicales libres. Estos pueden ser hidrofóbicos como las quinonas y el α -tocoferol o vitamina E, éste último considerado como un excelente antioxidante ya que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas, donde es un eficaz protector, evitando la lipoperoxidación; o hidrofílicos como el GSH que participa en la reacción descrita previamente. En muchos estudios se ha demostrado que el nivel de antioxidantes es de vital importancia para prevenir, revertir o al menos reducir el daño causado por las ERO.

Ya producido el daño celular, el quinto nivel de defensa es la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren recambio constantemente, por lo que son periódicamente reemplazadas (Elchuri y cols., 2005; Muller y cols., 2006). En el caso de los eritrocitos, por sus características morfofuncionales, tienen una limitada capacidad de biosíntesis y de mecanismos de reparación, por lo que acumulan modificaciones físicas y bioquímicas en su estructura, las cuales se acentúan con la edad de la célula, y la lesión celular asociada con estresantes físicos y químicos; esto conlleva a alteraciones en su metabolismo y de las defensas antioxidantes, lo que permite la oxidación de la hemoglobina (Hb), promoviendo su agregación y la unión de autoanticuerpos naturales y por lo tanto la peroxidación lipídica o lipoperoxidación de la membrana celular (Coimbra y cols., 2006). Estos aspectos serán discutidos posteriormente en el los mecanismos de daño oxidativo en el eritrocito.

4. LIPOPEROXIDACIÓN

Como consecuencia del metabolismo celular en el ser humano, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por antioxidantes endógenos, pero también pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares, provocando su peroxidación (Estepa y cols., 2001). La peroxidación lipídica o lipoperoxidación (LPO) juega un papel muy importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades. Las investigaciones químicas indican que la LPO es un conjunto de reacciones en cadena mediada por los radicales libres, que producen la degradación oxidativa de los lípidos.

En este proceso los radicales libres sustraen electrones a partir de un átomo de hidrógeno del grupo reactivo metileno (-CH₂-) de los lípidos (HL), proceso que deja un electrón impar en el átomo de carbono del grupo metileno, lo que promueve una transposición de las uniones dobles adyacentes al grupo metileno y produciendo radicales alquilo (L[•]). La membrana celular que esta constituida principalmente de lípidos, sufre LPO resultando en un daño a la célula, como es el caso de la hemólisis de los eritrocitos.

En la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poli-insaturados, ya que presentan enlaces dobles múltiples, entre los cuales existen grupos metileno (-CH₂-) que poseen hidrógenos reactivos. Se presenta en tres fases principales: iniciación, propagación y terminación (Cañas y cols., 1988) (**Figura 2**).

Ante la presencia de O₂, los radicales alquilo reaccionan formando radicales peroxilo (LOO[•]), que pueden sustraer un átomo de hidrógeno para producir peróxido lipídico (LOOH) y propagar la reacción hacia otras moléculas. El LOOH resultante se descompone en presencia de iones activos de hierro (Fe), formando más especies reactivas como (LOO[•]), alcoxilo (LO[•]), o radicales epoxiperoxilo (OLOO[•]). Estas

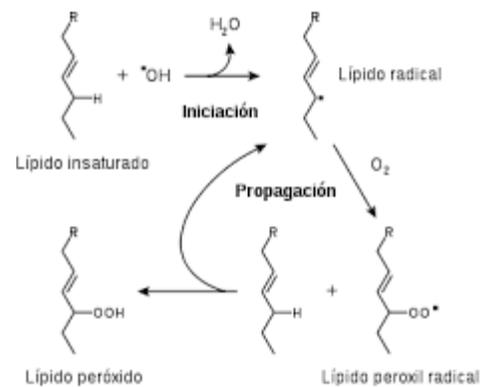
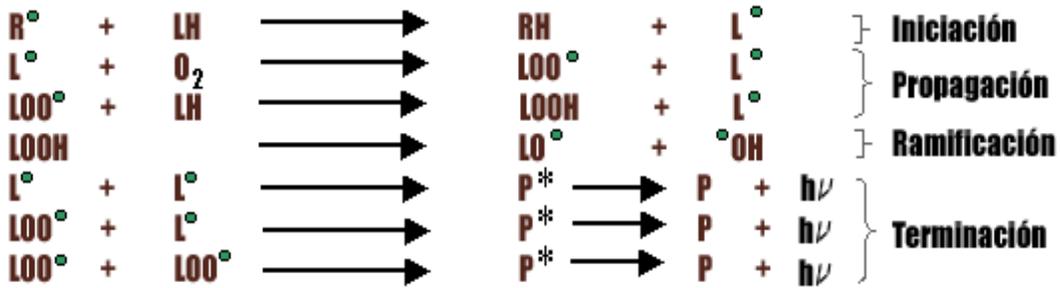
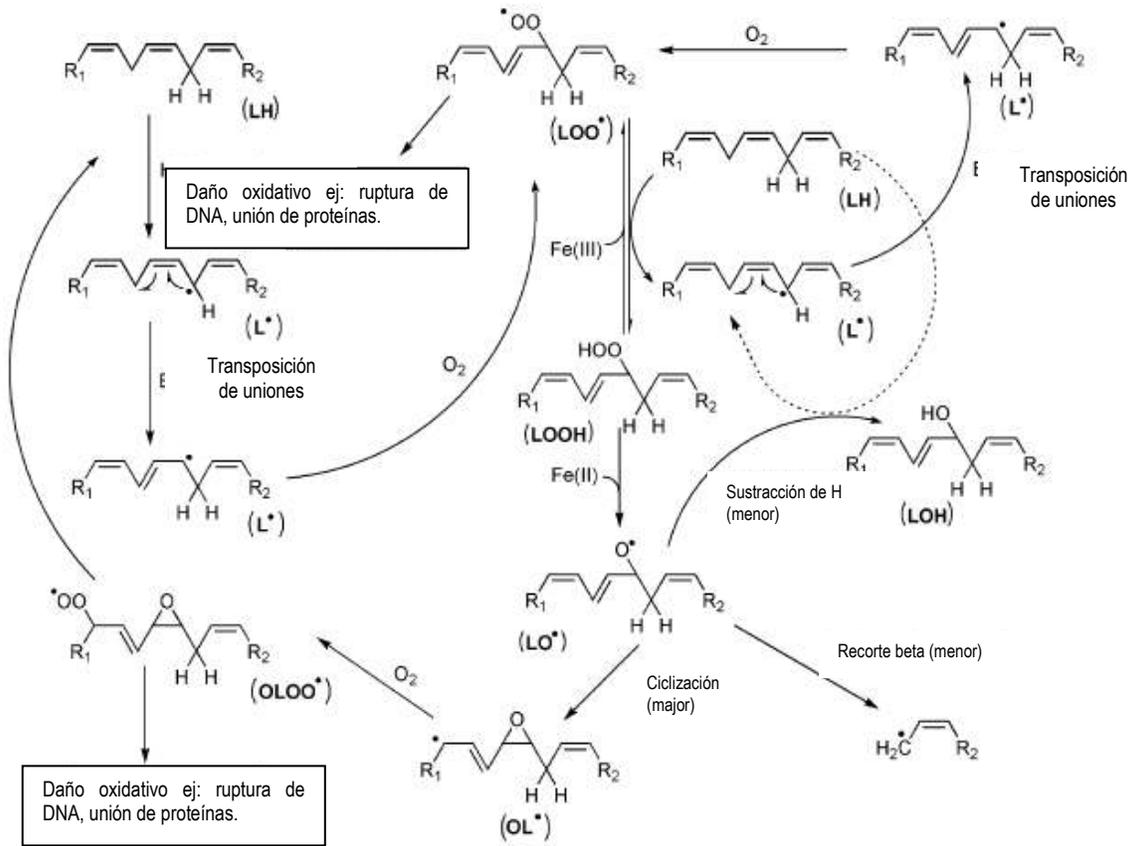


Fig. 2. Fase de iniciación, propagación y terminación de la lipoperoxidación.

especies pueden sustraer átomos de hidrógeno de los lípidos para propagar la LPO o terminar la reacción en cadena por dimerización o por el ataque a proteínas y el DNA para causar daño oxidativo y uniones cruzadas de proteínas/DNA (Cheng y Li, 2007) (**Figura 3**). Uno de los factores que puede influir en el acortamiento de la vida media del eritrocito son los diferentes niveles de LPO que en él se producen (Valenzuela y cols., 1983; Cañas y cols., 1988).

Se sabe que el Fe (siempre como un complejo) es un efectivo catalizador en la LPO, pero aún existen dudas de cómo se lleva a cabo dicho proceso. La reacción de Fenton, se ha considerado el mecanismo por el cual se producen radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) altamente oxidantes para sustraer átomos de H de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs), pero las enzimas que degradan el H_2O_2 o descomponen los radicales hidroxilo raramente inhiben la peroxidación dependiente del Fe. De manera similar esta en controversia que los radicales aniónicos superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sean los iniciadores de la LPO por la vía de la reacción de Haber-Weiss o directamente por la sustracción de H debido a que la superóxido dismutasa (SOD) no tiene efecto en el superóxido presente en el sistema de LPO. Dado que la dependencia de Fe en diferentes sistemas de LPO está constituido inicialmente de Fe (II) y que los liposomas fosfolipídicos requieren de la oxidación con Fe (II), y en otros sistemas que la LPO requieren de Fe (III) y los liposomas requieren de Fe (III) para su reducción, la hipótesis que envuelve el complejo Fe (II)- O_2 -Fe (III) en relación (1:1) debería ser considerada como causa de LPO. Ya que es difícil aislar dichos compuestos queda en duda si la LPO inicia con estos compuestos estequiométricos, ya que el Fe (III) no es fundamental para la lipoperoxidación. Considerando los óxidos que se forman en las reacciones catalíticas de peroxidación, algunos investigadores sugieren que la LPO asociada a Fe podría ser iniciada por el ión ferril (FeO_2^+) o el ión perferril (Fe_2^+O_2).

Esto crea confusión en los mecanismos de LPO y su relación al daño celular, así como los mecanismos de la actividad antioxidante de ciertos compuestos, que deberán ser resueltos en diferentes procesos de investigación. Se considera que las enzimas como la lipooxigenasas que utilizan PUFAs como sustratos reductores catalizan los LPO de forma enantiomérica.



LOO[•] : Radical lipídico peróxido
LOOH : Hidroperóxido
hν : Cuantos de luz

Fig. 3. Lipoperoxidación y radicales derivados de la oxidación de lípidos. La reacción se inicia cuando el radical libre le quita un átomo de hidrógeno a una cadena lateral de un ácido graso poliinsaturado, lo cual deja un electrón desapareado sobre un átomo de carbono. A su vez, el radical carbono así formado reacciona con el oxígeno, con lo cual se crea el radical peróxido, que es altamente reactivo y puede unirse a proteínas de membrana o a cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes, originándose con todo ello una reacción en cadena. El proceso culmina cuando se agota el sustrato y se produce la liberación de cuantos de luz.

En adición, especies de Fe hipervalente generadas por las proteínas heme o complejos simples de Fe muestran reactividad específica hacia los lípidos. De igual manera la presencia de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) en muestras de lípidos, incrementan la iniciación de la LPO. El Fe es capaz de descomponer los radicales a peróxidos lipídicos, que sustraen hidrógenos y propagan la reacción en cadena. Sin embargo, la detección de radicales superóxido o hidroxilo no son necesariamente un indicador de la iniciación de la LPO. Existen especies más efectivas en la formación de LPO, como los derivados de los radicales lipídicos LOOH (iniciación secundaria), compuestos de Fe hipervalentes y oxidación enzimática. De igual manera se consideran el Fe (II), Fe (III), quelantes y otros metales catiónicos.

4.i. Fuentes de Hierro (Fe) en la lipoperoxidación

El Fe es un elemento esencial para el crecimiento y supervivencia de los organismos. El 65% de las diferentes formas de Fe se encuentra unido a la hemoglobina, 10% presente en la mioglobina, citocromo y enzimas que contienen hierro, y 25% a las proteínas que almacenan hierro, ferritina y hemosiderina. La capacidad de unión del Fe, le permite variar su estado de oxidación, potencial de reducción y configuración electrónica, participando en varias actividades biológicas. Por un lado es un cofactor esencial para muchas proteínas (citocromo, hierro-sulfato y proteínas heme). Por otro lado es un catalizador de reacciones químicas que forman radicales libres con el consecuente estrés oxidativo y daño a la célula. La reacción de formas activas de oxígeno con las PUFAs en las biomembranas, producen un daño celular con el Fe, en algunos casos proteínas que contienen Fe inducen a la LPO.

La reacción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con el Fe (II) de la hemoglobina (oxiHb y dioxiHb) y Fe (III) con hemoglobina (metHb), produce ferrilhemoglobina (ferrilHb) y oxiferrilhemoglobina (oxiferrilHb), y ambas están implicadas en el daño celular. Los efectos citotóxicos asociados con la hemoglobina (Hb) o mioglobina (MHb) se deben a sus reacciones redox con los peróxidos que forman su estado de oxidación férrica de las proteínas, análogos a los compuestos Fe I y Fe II formados en el ciclo de catálisis de muchas enzimas de peroxidación.

El estado de oxidación de las proteínas como agente oxidante, promueve el daño oxidativo a la mayoría de las moléculas biológicas, incluyendo la LPO. El ingreso, almacenamiento y usos del Fe libre en el organismo esta controlado por proteínas y enzimas reguladoras (PRFe) de Fe para minimizar los efectos tóxicos, previniendo alteraciones en la salud del individuo. Las PRFe se encuentran en el citosol, regulan y se unen al ARN mensajero de muchas proteínas que participan en el metabolismo de la célula.

La generación de Fe libre, debido a degradaciones no enzimáticas de las proteínas heme, están implicadas en su toxicidad. En condiciones de estrés oxidativo, el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) es generado inmediatamente, y es capaz de reducir la forma férrica (ferritina) a ferrosa y producir liberación de Fe (**Figura 4**).

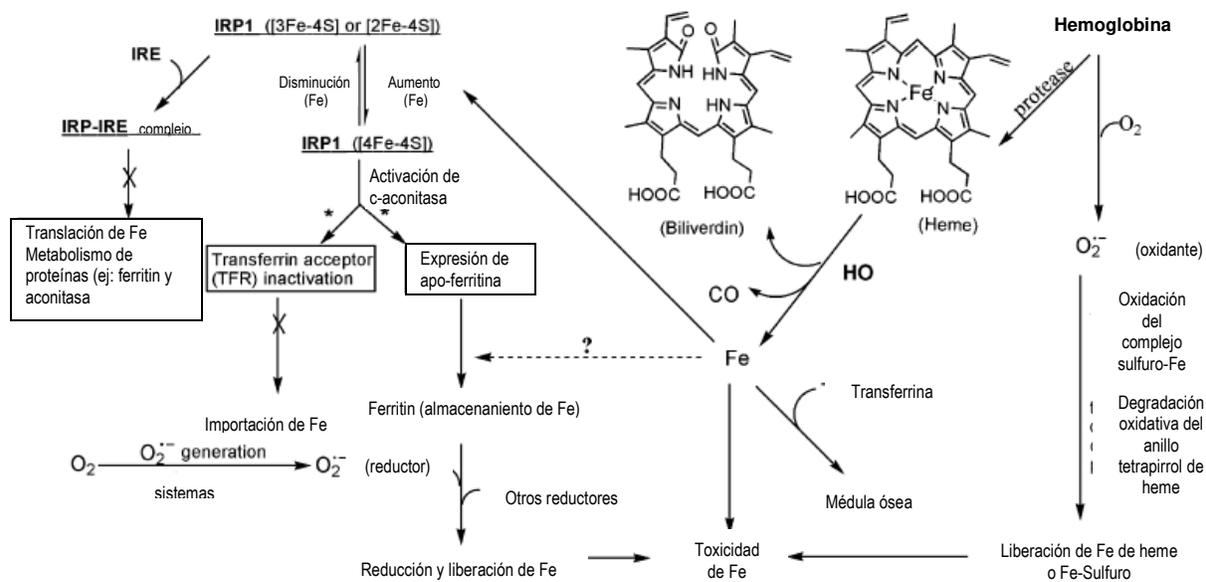


Fig. 4. Regulación y liberación de Fe bajo condiciones de estrés oxidativo.

Un sistema enzimático variado, como es la xantina/xantina oxidasa (XO), la nicotinamida adenina dinucleotido (NADH)/ el sistema de oxidasa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), y el sistema hipoxantina (HX)/XO, participan en la producción de $O_2^{\cdot -}$ (Cheng y Li, 2007).

4.ii. Producto final derivado 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 araquínico 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) (**Tabla 2**).

Substancia	Agente	Derivados	Producto de degradación metabólica	Producto final cuantificable
Peróxido lipídico ó Lipoperóxidos	Lipoproteínas	Isoprostanos	Aldehídos (LOOH')	Malondialdehído (MDA)
	Ácido araquidónico	Isómeros de las prostaglandinas		4-hidroxinonenal
Productos de Tirosinas	Mieloperoxidasa	Halogenación	Alcanos	Etano Pentano Incremento en neutrófilos
Productos de Tirosinas	Mieloperoxidasa	Nitración	Sintasa óxido nítrico (iNOS)	Activación de macrófagos 3-nitrotirosina
			3-nitrotirosina	

Tabla 2. Productos finales derivados de la lipoperoxidación.

4.iii. Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído (**Figura 5a**) es un compuesto volátil ($C_3H_4O_2$), de bajo peso molecular (P.M. = 72.07 g/mol) de cadena corta 1,3-dicarbonilo y moderadamente ácido débil ($pK_a = 4.46$). En solución y en fase de gas el MDA es completamente enolizado, formando 2 moléculas asimétricas unidos por puentes de hidrógeno intramoleculares (**Figura 5b y 5d**), con una barrera baja para formar una estructura simétrica con uniones hidrógeno (**Figura 5c**).

El MDA tiene una absorvancia en la región UV tanto en solución acuosa ácida ($\lambda_{max} = 245$ nm; $\epsilon \sim 13 \times 10^3$) como básica ($\lambda_{max} = 267$ nm; $\epsilon \sim 30 \times 10^3$). El enol de MDA libre de ácido es más reactivo que la base conjugada, particularmente con nucleófilos.

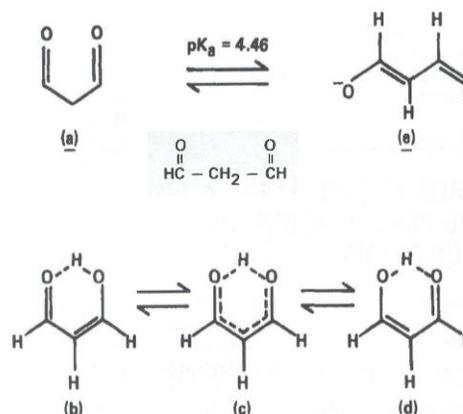


Fig. 5. Estructura química del MDA.

Reactivo	Pigmento	
	λ_{max}	$\epsilon \times 10^3$
Acido Barbitúrico	485	n.d.
TBA	532	153.0
TBA	532	156.0
TBA	530	158.0
TBA	532	159.2
Dietil-2-TBA	540	n.d.
Difenil-2-TBA	537	n.d.

n.d. = no determinado
valores de diferentes autores

Tabla 3. Reacción del MDA con sustancias que producen pigmentos.

El MDA actúa como nucleófilo o como electrófilo y forma aductos pigmentados multiméricos con absorvancia en la región UV. Al calentar el MDA a un pH bajo, participa en reacciones de adición y cicloadición con nucleófilos como el TBA, produciendo productos pigmentados de condensación (**Tabla 3**). La reacción MDA-TBA produce un pigmento rojo con una absorción molar de 5 a 10 veces mayor que el MDA.

El MDA es un isoprostano derivado de la peroxidación de los lípidos, cuyo producto final es un aldehído. El MDA se forma cuando los ácidos grasos polinsaturados (LH) ó lípidos (como los de la membrana celular), al ser afectados por las ERO sobre los radicales lipídicos (L^{\cdot}) se transforman por efecto de la oxidación a radicales peroxilo (LOO^{\cdot}), formando dienos conjugados hidroperóxidos (**Figura 6**). El MDA tiene una vida media muy corta, pues reacciona rápidamente con grupos amino libres procedentes de los fosfolípidos, aminoácidos y proteínas presentes en el suero (Estepa y cols., 2001), También con fuentes no lipídicas como los carbohidratos y las glicoproteínas, pirimidinas, hemoglobina y bilirrubina.

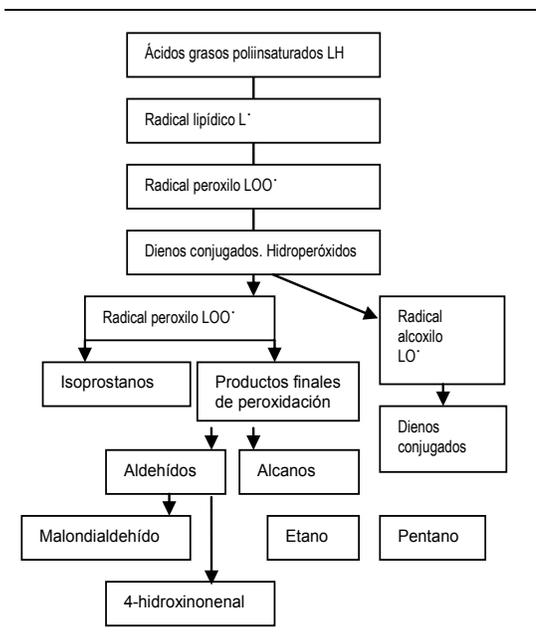


Fig. 6. Mecanismo de formación del MDA

La habilidad del MDA de alterar o unirse a una amplia variedad de macromoléculas podría contribuir a su toxicidad y a sus propiedades mutagénicas/carcinogénicas podrían formar aductos los ácidos nucleicos (Basu y cols., 1988).

5. EL ERITROCITO

Debido a que los eritrocitos son células que presentan ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en su membrana plasmática, por su función de transportar oxígeno y a su elevada concentración de hierro (Fe) y hemoglobina, son muy sensibles al estrés oxidativo por lo que pueden sufrir lipoperoxidación y degradación de proteínas. 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 (carbonilación) y del citoesqueleto. Considerando que este trabajo de investigación está enfocado a la acción de los metabolitos antioxidante de los extractos de tejocote (*Crataegus mexicana*) 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 el tejocote.

5.i. Embriología del Eritrocito

En 1817, Francois Magendie realizó las primeras descripciones morfológicas del eritrocito. Hoppe-Seyler (1865), descubrió la capacidad de la hemoglobina (Hb) de transportar oxígeno. Son células que embriológicamente provienen del mesodermo, y forman parte del tejido conectivo laxo especializado. Se forman por eritropoyésis en diferentes órganos hematopoyéticos, principalmente en el hígado y bazo, y en la médula ósea durante toda la vida; su vida media es de 100 a 120 días ó 4 meses.

Se requieren varias sustancias para el correcto desarrollo de los eritrocitos, como aminoácidos, hierro, cobre, vitamina B₂ (riboflavina), B₁₂ (cianocobalamina), piridoxina y ácido fólico. Además de la hormona eritropoyetina (EPO) que se produce en los riñones (Geneser, 2001; Mckenzie, 2000). Los eritrocitos son la forma terminal y madura de los eritroblastos (**Figura 7**). El ciclo de vida de los eritrocitos puede ser dividido en tres fases:

1. La primera es la eritropoyesis, que consiste en la producción de los eritrocitos en los órganos hematopoyéticos, mismos que maduran durante 5 a 7 días a partir de los proeritroblastos policromatofílicos, los cuales se transforman en eritroblastos ortocromáticos y maduran finalmente a eritrocitos. Esta fase es considerada como una apoptosis parcial.
2. La segunda fase es la salida de los reticulocitos de los órganos hematopoyéticos al torrente sanguíneo que terminan de madurar en un día para convertirse eritrocitos maduros, con una vida media de 100 a 120 días.
3. La tercera fase es la destrucción de los eritrocitos (hemocaterésis o eriptosis) que han envejecido en el sistema retículo endotelial.

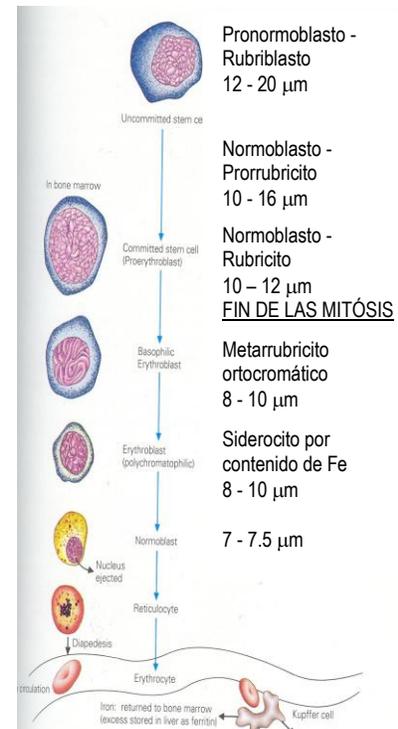


Fig. 7. Hematopoyesis y pérdida del núcleo del eritrocito.

La eritropoyetina es la hormona que induce la eritropoyesis y regula la cantidad y vida de los eritrocitos en la sangre. Su liberación es por la presión parcial de O_2 en la sangre, la disminución de O_2 , incrementan la concentración de eritropoyetina. La eritropoyetina también es capaz de detener la apoptosis del eritroblasto, modulando la proteína antiapoptótica Bcl-X_L, disminuyendo la actividad de las caspasas involucradas en la desaparición de los organelos y núcleo durante la formación del eritrocito, junto con la participación de enzimas hidrolíticas del ADN (ADNsas II), que permiten la maduración y la pérdida del núcleo del eritroblasto por un proceso denominado remoción heterofágica (**Figura 8**).

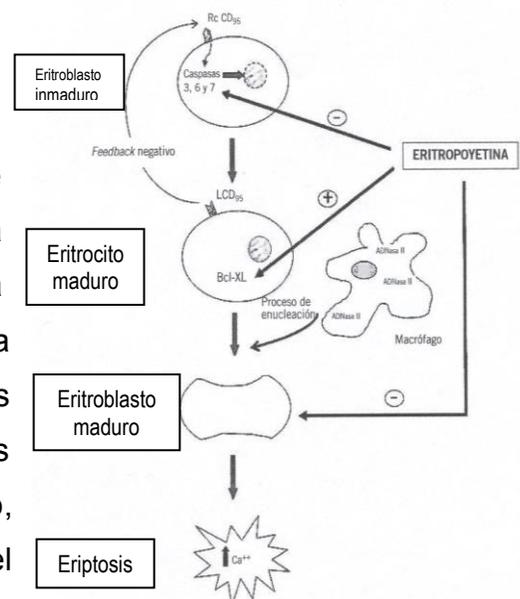


Fig. 8. Mecanismos de acción de la eritropoyetina en el proceso de eriptosis.

5.ii. Fisiología y 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 (**Figura 9**). Su principal función es el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono en la sangre. En sangre circulan aproximadamente 5 millones de células rojas por milímetro cúbico (mm^3) (5 millones/ $1\mu\text{L}$) siendo mayor la cantidad en hombres que en mujeres (Geneser, 2001; Mckenzie, 2000).



Fig. 9. Forma y tamaño de eritrocitos humanos (8 μm)

Su citoesqueleto está constituido por proteínas fibrosas y globulares, lo que le confiere características biológicas relacionadas a su estructura-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, ya que existen muchas enfermedades que afectan los eritrocitos (**Tabla 4**) (Mackenzie, 2000).

5.iii. Composición molecular de la membrana del eritrocito

Existen más de 50 proteínas de membrana en el eritrocito. Veinticinco presentan los antígenos de los grupos sanguíneos A, B, y Rh, mantienen la forma de la célula, el transporte de iones y moléculas, adhesión e interacción con otras células, actúan como receptores mensajeros y otras funciones. El tipo sanguíneo depende de las variaciones de las glucoproteínas en la membrana del eritrocito. Las proteínas de la membrana del eritrocito se organizan de acuerdo a sus funciones (**Tabla 5**).

Tabla 4. Denominación de la morfología del eritrocito por cambios patológicos en diferentes enfermedades y condiciones patológicas.			
Término utilizado	Morfología	Enfermedades o situaciones clínicas en donde están alterados.	
Normocito	Normal en tamaño y forma	Sujeto sano	
Normocrómico	Normal en color y contenido de Hb	Anemia normocítica normocrómica (enfermedades inflamatorias, LES, artritis, sarcoidosis, enfermedades pulmonares, TBC, pielonefritis, hepatopatía alcohólica).	
Anisocitosis	Variación en el tamaño	Transfusión incompatible.	
Poiquilocitosis	Variación en la forma	Todas	
Hemólisis	Ruptura de los eritrocitos	Anemia hemolítica.	
Anisocromía	Diferentes colores	Inicio de tratamiento en la anemia carencial, enfermos con anemia hipocroma que son trasfundidos.	
Hipocrómico	Color pálido, falta de Hb	Falta de oxigenación, anemia ferropénica, anemia normocítica normocrómica, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia mieloptisica, anemias endócrinas y nefrógenas, anemias de enfermedades crónicas (infecciosas, neoplásicas y enfermedades sistémicas), anemia megaloblástica,	
Hipercrómico	Color más oscuro que el normal	Exceso de hierro, esferocitosis hereditaria.	
Microcito	Tamaño menor al normal	Anemia microcítica hipocrómica, talasemia, anemia siderocréstica, anemia ferropénica.	
Macrocito	Tamaño mayor al normal	Alcoholismo, hepatopatía alcohólica, anemia megaloblástica.	
Equinocito, estereocitos o astrocitos (erizo)	Célula fresca; célula crenada	Sujetos alcohólicos, uremia, deficiencia de K, y hepatopatías neonatales.	
Acantocito (espina)	Célula en espina, espuela	Colesterol alto, abetalipoproteinemia, cirrosis hepática, mielofibrosis, por altas dosis de heparina,	
Estomatocitos (boca)	Boca, taza, casquete de hongo	Alcoholismo y hepatopatías alcoholicas.	
Gránulos basofílicos de Cuerpos de Heinz	Condensación de hemoglobina en varios puntos	Enfermedades congénitas y por medicamentos.	
Esquistocitos	Fragmentada	Anemia microangiopática, hemólisis por válvulas cardiacas, quemaduras graves.	

La mayor parte del citoesqueleto esta formada por la proteína espectrina (**Figura 10**). La espectrina forma un reticulado filamentoso fijado en parte a una proteína transmembrana del plasmalema (membrana plasmática), la proteína de banda 3 (por su movilidad electroforética de la membrana del eritrocito).

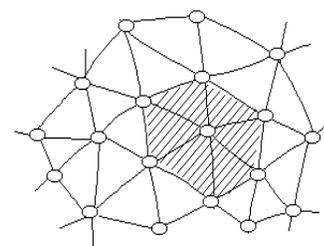


Fig. 10. Dibujo esquemático de la molécula de Espectrina (red), anclada a Ankirina (elipses).

Tabla 5. Estructura función de las proteínas de membrana del eritrocito.		
Tipo de proteína	Proteína	Función
De transporte	Banda 3 (90-100 KDa)	Proteína de intercambio aniónico. Transporte de aniones, componente estructural, 25% de la superficie de la membrana, un millón de copias por célula, Define al grupo sanguíneo Diego.
	Acuaporina 1	Proteína integral transmembrana. Transporte de agua, define al grupo sanguíneo Colton.
	Glut1	Transporte de glucosa y ácido L-dehidroascórbico.
	Proteína antigenica Kidd	Transporte de urea.
	RhAG	Transporte de gas como dióxido de carbono, define al grupo Rh y se asocia al fenotipo del grupo inusual Rh-nulo.
	Na ⁺ /K ⁺ - ATPasa	Regulador energético y de la concentración de cationes intracelulares
	Ca ²⁺ - ATPasa	Regulador energético y de la concentración de cationes intracelulares
	Na ⁺ K ⁺ 2Cl	Cotrasportador
	Na ⁺ - Cl-	Cotrasportador
	K - Cl	Cotrasportador
Adhesión celular	Canal Gardos	Transporte de Ca ²⁺ y K ⁺
	ICAM-4 BCAM	Interactúa con las integrinas Glucoproteína que define al grupo sanguíneo Lutheran, también conocido como Lu o proteína de unión a laminina
Función estructural		Establecen uniones con las proteínas esqueléticas, regulan la cohesión del citoesqueleto y la bicapa lipídica, mantienen la superficie celular evitando el colapso (vesiculación o bebbing).
	Ankirina (215 KDa)	Complejo proteico macromolecular que une el citoesqueleto con la capa bilipídica por interacción de dominios citoplasmáticos con Ankirina. Se une a la proteína transmembranal Banda 3. Tiene un ácido graso de anclaje llamado palmitato lo que estabiliza su unión a la membrana celular.
	Banda 3 (90-100 KDa)	Une varias enzimas glucolíticas, transportador presuntivo de CO ₂ y anhidrasa carbónica hacia el complejo macromolecular "metabolon" que regula el metabolismo de la membrana celular, y transporte de gases y iones
	RhAG	También funciona como transportador, se asocia al fenotipo del grupo inusual Rh-nulo.
	Proteína 4.1R (78KDa)	Complejo proteico macromolecular que interactúa con proteínas 4.1R. Expresa débilmente al antígeno Gerbich. Une a la espectrina con la glucoaporina C.
	Banda 4.2 Palladin (72KDa)	Estabiliza la unión entre ankirina y el intercambio aniónico
	Glucoporina C y D (25KDa)	Glucoproteína que define al grupo sanguíneo Gerbich
	XK	Define al grupo sanguíneo Kell y al fenotipo inusual McLeod (carece del antígeno Kx y reduce la expresión del antígeno Kell).
	RhD/RhCE	Define al grupo Rh y se asocia al fenotipo del grupo inusual Rh-nulo.
	Proteína Duffy	Se asocia a la limpieza de quimioquinas
	Aducin (100-105 KDa)	Interactúa con la banda 3
	Banda 4.9 Dematin (48 KDa)	Interactúa con el transportador de glucosa Glut1, se une con Actin
	Alfa-Espectrina (260 KDa) BetaEspectrina (225 KDa)	Polipéptido fibrilar, forman una hélice alfa-beta con un tetramero en su porción terminal que se unen a otras proteínas como la ankirina y a la misma espectrina.
	Actina (43KDa) Actina (27 KDa) Tropomiosina (29 KDa)	Se une a espectrina y Aducina
Tropomodulin	Se une a Actin	

Estas se unen a la anquirina y a la glucoferina por intermedio de otra proteína de anclaje denominada proteína de banda 4,1 y de una pequeña porción de filamento de actina (**Figura 11**). El citoesqueleto le da soporte a la membrana celular (Luna y Hitt, 1991). Una forma de regular la función de las proteínas es por la adición de uno o más grupos fosfato a una proteína por enzimas llamadas fosfoproteínas fosfatasa. Esta adición es por medio de fosforilación, y su remoción es por medio de desfosforilación.

La fosforilación de las proteínas mayores como la ankirina y las proteínas de las bandas 4.1 y 4.9, debilitan la rigidez del citoesqueleto reduciendo la afinidad de unión de estos componentes, sin embargo este control esta aún bajo investigación, incluyendo los proceso que se lleva a cabo por el estrés oxidante y la acción de EROs en estas proteínas.

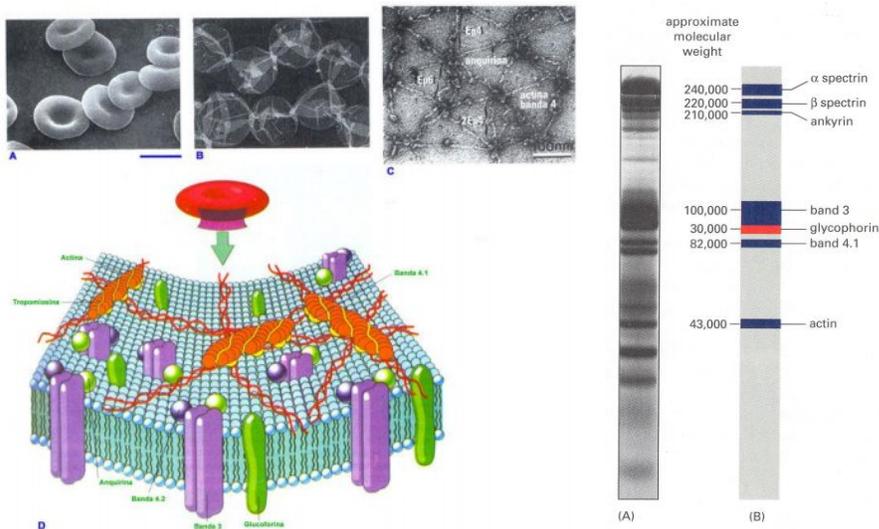


Fig. 11. Dibujo esquemático de la composición molecular del citoesqueleto y plasmalema de un eritrocito, así como sus componentes en un gel de electroforesis.

Aunque la mayor parte de los ácidos grasos se encuentran unidos a proteínas, existe una pequeña proporción que esta libre en la célula. Éstos ácidos grasos libres (AGL) pueden interaccionar con la membrana celular, alterando el potencial de membrana y con ello produciendo una translocación de protones por un mecanismo conocido como flip-flop, que es un efecto desacoplante que ocurre por el acarreo inespecífico de protones del espacio intermembranal interno y externo. En este proceso el transporte activo que llevan a cabo los aminofosfolípidos de la membrana de afuera hacia dentro (flip) es mayor que de adentro hacia fuera (flop) por un fenómeno de traslocación de la monocapa lipídica, lo que daría origen a una asimetría, fenómeno que se presenta en la sangre almacenada.

La función del citoesqueleto es fundamental, si las proteínas y lipoproteínas de la bicapa de la membrana pierden su organización, el eritrocito se vera alterado en todos sus procesos hemostáticos y tiempo de vida (Kuypers y cols., 1996).

La membrana del eritrocito es un complejo proteínico bifosfolípido (anfipático) compuesto por 52% de proteína, 40% de lípidos y 8% de carbohidratos (**Figura 11, Tabla 6**). La estructura química y su composición controlan las funciones de transporte, flexibilidad y propiedades antigénicas de la membrana. Cualquier defecto en la estructura o alteración en la composición química de la membrana pueden producir alteraciones en alguna o todas las funciones y producir la muerte prematura del eritrocito (Mckenzie, 2000). El colesterol no esterificado influye en el área de la superficie de la célula y es responsable de la permeabilidad pasiva de cationes. Las elevaciones en el colesterol plasmático, conlleva a la acumulación de colesterol en su membrana; los eritrocitos saturados de colesterol se observan como células en forma de tiro al blanco y espículadas, y presentan aumento de la microviscosidad y grado de organización de la membrana.

Tabla 6. Composición química de la membrana celular del eritrocito (% de peso seco).

I. Lípidos			
A. Colesterol no esterificado	12%		
B. Fosfolípidos	20-25%		
Cefalina		95%	
Lecitina			
Esfingomielina	6%		
Fosfatidilserina	5%		
Fosfatidilcolina	7%		
Ac. Fosfatídico	<1%		
Fosfatidiletanolamina	5%		
C. Otros	Lisolecitina	3%	5%
D. Glucolípidos			
Flucoesfingolípidos			
Cerebrósidos	<1%		
Gangliósidos			
II. Proteínas			
Glúcidos	7%		
A. Proteínas integrales			
Glucoforinas A, B, C			
Banda 3			
B. Proteínas periféricas			
Espectrina			
Actina			
Anquirina (banda 2.1)			
Banda 4.2			
Banda 4.1			
Aducina			
Banda 4.9 (dematina)			
tropomiosina			
III. Carbohidratos			8%

Las moléculas de los fosfolípidos están dispuestas con sus cargas polares dirigidas hacia adentro y hacia fuera de la célula, y sus extremos hidrofóbicos, dirigidos hacia el interior de la doble capa. La movilidad de los fosfolípidos dentro de la membrana, contribuyen a la fluidez de la misma. Los lípidos relacionados con las proteínas integrales de la membrana se adhieren por ligaduras iónicas y de hidrógeno, y parecen difundir como una sola unidad. Las enzimas relacionadas con los lípidos, requieren de su presencia para alcanzar una actividad enzimática completa.

La membrana celular también presenta distintos receptores transmembranales para un sinúmero de sustancias y antígenos de superficie (Gunalan y cols., 2011). El

eritrocito presenta un potencial zeta normal de -15.7 milivolts (mV), el cual está dado por los residuos de ácido sialico expuestos de su membrana, si se elimina el ácido siálico el potencial es de -6.06 mV.

a. Metabolismo del eritrocito

El metabolismo de los eritrocitos es limitado, debido a la ausencia del núcleo, mitocondrias y otros organelos subcelulares. Debido a que la unión, transporte, liberación de oxígeno y bióxido de carbono es un proceso pasivo que no requiere energía, existe una variedad de procesos metabólicos dependientes de energía que son esenciales para la viabilidad del eritrocito. Las vías metabólicas más importantes para el eritrocito maduro requieren de glucosa como sustrato, desdoblándose a lactato (**Tabla 7**). De esta manera estas vías metabólicas contribuyen a mantener el K intracelular alto, el Na intracelular bajo, y el Ca⁺⁺ intracelular muy bajo (bomba de cationes), mantienen a la Hb en forma reducida, mantiene elevados los valores de Glutación (GDH) reducido, y ayuda a mantener la integridad y deformabilidad de la membrana.

Tabla 7. Vías metabólicas en el eritrocito.	
a. Vía Embden-Meyerhof	Proporciona ATP para la regulación de la concentración intracelular de cationes (Na, K, Ca, Mg) a través de bombas de cationes.
b. Ciclo de la hexosa-monofosfato	Proporciona NADPH y glutatión para reducir oxidantes celulares
c. Ciclo de Rapoport-Luebering	Forma 2,3-BPG el cual facilita la liberación de oxígeno a los tejidos
d. Vía de la metahemoglobina reductasa	Protege a la hemoglobina de la oxidación vía NADH y metahemoglobina reductasa

5.iv. Hemocaterésis ó Eriptosis, la apoptosis del eritrocito

La apoptosis o muerte celular programada fue descrita en 1972 por Kerr y Searle, utilizando un concepto griego de Apo (απο) = desde, y Ptois (πτωσις) = caída o prolapso de un órgano o parte de él. Se refiere un programa suicida intrínseco de las células, en el que la célula muere de forma fisiológica normal y ordenada sin producir daño en la organización de los tejidos a que pertenece, sin causar una reacción inmunológica o inflamatoria que afecte a las células vecinas y con ello mantener la integridad del tejido. La apoptosis se caracteriza por la reducción del tamaño de la célula por condensación del contenido celular y colapso del citoesqueleto, la ruptura de las membranas nucleares, el ADN se fragmenta, la membrana cambia y se forman cuerpos

apoptóticos (pequeñas vesículas de membrana) que pueden ser reconocidos por células vecinas o macrófagos para ser fagocitados.

Hipócrates en el siglo V a.C. ya mencionaba el concepto de la destrucción fisiológica de células y tejidos. Posteriormente Virchow en 1858 describió 2 tipos de muerte celular, la necrobiosis (muerte espontánea por partes y natural, actualmente se le llama apoptosis) y la necrosis (muerte violenta causando ruptura del eritrocito). La apoptosis es un fenómeno fundamental en el desarrollo embrionario, en la metamorfosis, en la atrofia tisular y regresión tumoral. Las células que mueren por este mecanismo son las células sin función, células formadas en exceso, células defectuosas, células con defectos deletéreos y las células que han completado su ciclo de vida.

La eriptosis es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito empleada fisiológicamente por el organismo para destruir eritrocitos envejecidos, sin daño necrótico (hemolítico). La eriptosis comparte mecanismos propios de las etapas finales de la apoptosis, incluyendo la actividad de proteasas, la externalización de fosfatidilserina y la formación de microvesículas apoptóticas. La eriptosis es importante para evitar la hemólisis, así como las respuestas inflamatorias e inmunológicas en la destrucción de los eritrocitos. Se puede considerar que la eriptosis es solamente el final de una apoptosis, que inició cuando maduraba a eritrocito (Quintanar y Calderón, 2006) (**Tabla 8**). En fase adulta, el eritrocito carece de núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico y de otros organelos esenciales, por lo que son incapaces de sintetizar nuevos componentes de membrana, lo que reduce su tiempo de vida.

Tabla 8. Diferencias celulares entre apoptosis y eriptosis en el eritrocito, el eritroblasto y células somáticas.			
Cambios observados	Célula Somática (Apoptosis)	Eritroblasto (Apoptosis)	Eritrocito (Eriptosis)
Lisis nuclear	X	X	
Lisis mitocondrial	X	X	
Fragmentación de ADN	X	X	
Translocación de citocromo C	X	X	
Despolarización mitocondrial	X	X	
Despolarización nuclear	X	X	
Activación de caspasas	X		X
Cambios en la membrana			X
Contracción celular			X
Perdida de K intracelular			X
Activación de canales de Ca			X
Activación de escramblasas*			X
Contracción celular			X
Activación de esfingomielinasa			X
Externalización de fosfatidilserina			X
Vesículas apoptóticas	X		X

* enzimas traslocadoras de fosfolípidos

Debido a esto, la energía necesaria que requiere el eritrocito se produce por glucólisis (Geneser, 2001; Mckenzie, 2000). Conforme envejece, su membrana plasmática cambia y es susceptible a ser fagocitado por los macrófagos en los órganos hematopoyéticos. Por tanto, los mecanismos de defensa y daño celular del eritrocito bajo diferentes condiciones metabólicas son importantes desde el momento que se forma hasta su muerte, ya sea por hemólisis o por eriptosis.

5.v. Mecanismos moleculares involucrados en la eriptosis

Los principales mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la eriptosis son la disminución de la carga energética de la célula (relación ATP/ADP, AMP) y la disminución del poder reductor del eritrocito a través de la relación NADP/NADPH y de la glutatión reducido/oxidada, así como por el estrés osmótico. Como se mencionará posteriormente, estos mecanismos pueden ser provocados por el envejecimiento, estrés metabólico, daño tóxico e infecciones entre otros (Quintanar y Calderón, 2006). Se debe considerar que el estrés metabólico (presente en varias enfermedades y alteraciones del metabolismo orgánico) puede inducir eriptosis por estrés energético, oxidativo y osmótico, en la que el daño celular es por la formación de radicales libres. En el caso del estrés energético la reducción de ATP afecta la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio y su incremento intracelular.

En el estrés oxidativo, la reducción de glutatión reducido (GSH) incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de calcio y causando un desequilibrio osmótico en el eritrocito. Por su parte el estrés osmótico activa a la fosfolipasa A₂, que libera ácido araquínóico de la fosfatidilcolina, dicho ácido es convertido por la enzima ciclooxigenasa (COX) a prostaglandina E₂ (PGE₂), la cual estimula el canal catiónico del que depende la entrada de calcio. Adicionalmente el estrés puede activar a la ciclooxigenasa. El incremento de calcio intracelular activa el canal Gardós (canal de potasio dependiente del calcio), que provoca la salida de potasio, induciendo la salida de agua y de cloro, causando la contracción del eritrocito. El incremento de Ca intracelular, la disminución de K y la

contracción celular, activan a una escramblasa de fosfatidilserina, que provoca la esternalización de la fosfatidilserina, o bien a través de la ceramida (**Figura 13**).

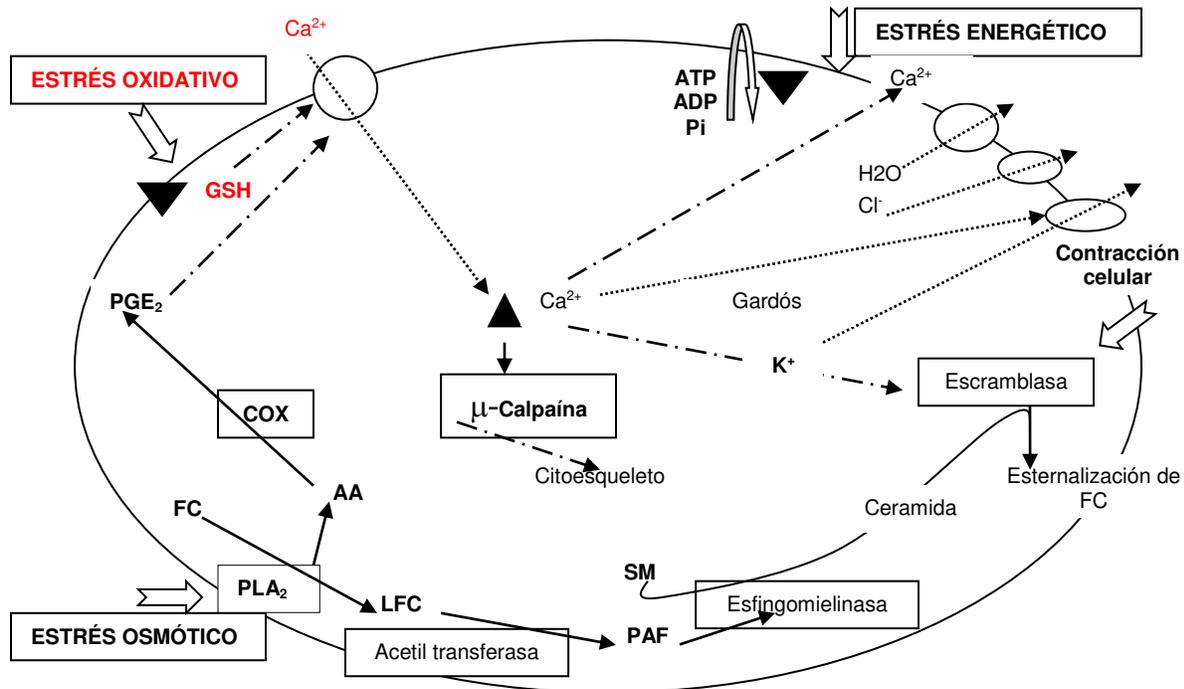


Fig. 13. Mecanismos moleculares de la eriptosis. Fosfolipasa A2, (PLA₂), ácido araquínico (AA), fosfatidilcolina (FC), lisofosfatidilcolina (LFC), factor de activación plaquetario (PAF), esfingomielina (SM), glutatión reducido (GSH).

Otra enzima involucrada en la eriptosis es la μ -calpaína, una proteasa de cisteína, la cual es activada por el calcio intracelular libre, la cual degrada proteínas del citoesqueleto, entre ellas la espectrina y la fodrina desestabilizando a las membranas e induciendo la formación de microvesículas (*blebbing*), características de la apoptosis y de la eriptosis, y causando modificaciones en la forma del eritrocito y por consiguiente cambios patológicos (Casciola-Rosen y cols., 1996; Zakai y cols., 1977; Spangler, 2011).

Estos cambios permiten mayor permeabilidad de la membrana, principalmente por la pérdida del K⁺ acompañado de la salida osmótica de agua intracelular y por lo tanto cambios en su organización y composición, lo que favorece la deshidratación en el eritrocito, y por consecuencia alteraciones en su fenotipo en relación a una mayor

adhesión, tonicidad y volumen, como se ha observado en la anemia de células falciformes o en enfermedades vaso-oclusivas. La adhesión de los eritrocitos también se ve influenciada externamente por la proteína de matriz endotelial trombospondina-1 (TSP), ya que al disminuir la TSP y la osmolaridad citosólica se incrementa la adhesión (Wandersee y cols., 2005).

5.vi. Mecanismos moleculares involucrados en la oxidación de proteínas por los radicales libres

Las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las ERO, su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones, como la oxidación de residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas (Cárdenas, 2006). En 1998, Kirchhoff indicó que la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una proteína la hacen más vulnerable a los radicales libres, principalmente en los sitios ligados a metales de transición. Se presenta por ataque oxidativo directo sobre los residuos de aminoácidos (Lis, Arg, Pro, Tre) y reacciona con un metal de transición (Fe^{2+} ó Cu^{+2}) reduce al H_2O_2 formando un intermediario reactivo ($\cdot\text{OH}$, radical ferril, etc.), los que posteriormente atacan a los aminoácidos adyacentes.

La modificación del contenido intracelular y extracelular del ion Ca^{+2} altera significativamente la función celular. El incremento de estos iones estimula la activación de proteasas, que atacan el citoesqueleto, y de nucleasas que fragmentan el ADN. La oxidación genera la carbonilación de las proteínas, formando aldehídos y cetonas, que se detectan con anticuerpos o con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Actualmente esto se considera como una de las principales causas de alteración metabólica. Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.

Los efectos de las ERO se pueden sumarizar como sigue (Chapple y Matthews, 2007):

- Desdoblamiento o doblamiento de proteínas (reversible o irreversible)
- Reacciones de fragmentación y polimerización de las proteínas
- Degradación de las proteasas en las proteínas modificadas

- Formación de radicales en las proteínas
- Formación ERO en las uniones proteicas
- Formación de productos finales estables (carbonil: oxo-ácidos o aldehídos, por ejemplo de alanina a acetaldehído)

El contenido de carbonilos de las proteínas puede ser usado como medida del daño producido en las mismas por procesos de oxidación. Hasta la fecha se han desarrollado diversos procedimientos muy sensibles para la detección y cuantificación de grupos carbonilos, siendo el más utilizado el método en el que se emplea el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que se conjuga con los carbonilos dando lugar a un compuesto que se mide espectrofotométricamente (Mayor, 2010) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Métodos para determinar el estrés oxidativo o daño en las proteínas del eritrocito.

<i>Marcadores</i>	<i>Método</i>
<i>Basados en la oxidación de Proteínas</i>	Compuestos carbonílicos
	Grupos sulfhidrilos
	Fragmentación de proteínas
	Actividad de enzimas
<i>Basados en la oxidación de ADN</i>	Grupos aminos libres
	Bases modificados

El daño a las proteínas de membrana del eritrocito puede ser iniciado por liberación de electrones, reacciones dependientes de iones metálicos y autooxidación de lípidos y azúcares. El daño oxidativo a las proteínas puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas (Dean y cols., 1997) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Modificaciones oxidativas de las proteínas

Tipo	Aminoácido involucrado	Fuentes de oxidación
Disulfidos, glutatiolación	Cis	Todos, ONOO-
Sulfóxido de metionina	Met	Todos, ONOO-
Carbonilos (aldehidos y cetonas)	Todos (Iis, Arg, Pro, Tre)	Todos
Oxo-histidina	His	Rayos γ , OCM, ozono, 1O_2 .
Ditirosina	Tir	Rayos γ , OCM, ozono, 1O_2 .
Clorotirosina	Tir	HOCl
Nitrotirosina	Tir	ONOO-
Modificaciones triptofanil	Trp	Rayos γ
Derivados hidroxil	Val, Leu, Tir, Trp	Rayos γ
Cloraminas y diamidación	Lis	HOCl
Aductos de lipoperoxidación (MDA, HNE y acroleína)	Lis, Cis, His	Rayos γ , OCM, ozono, 1O_2 .
Aductos con aminoácidos oxidados	Lis, Cis, His	HOCl
Aductos por glicosilación	Lis	Glucosa
Entrecruzamientos, agregados y fragmentación	Varios	Todos

OCM = oxidación catalizada por metales; Todos = rayos gamma, OCM, HOCl, ozono, 1O_2 .

Por otro lado, el MDA entrecruza proteínas como lo hacen las bases de Schiff conjugadas. Las bases de Schiff son grupos funcionales de las proteínas con enlace doble C-N y se forman de la glicación de las fosfoproteínas.

5.vii. Porcentaje del volumen de CRS (Hematocrito o FVE)

La sangre total con un pH de 7.36 a 7.44 está constituida por eritrocitos (células rojas), leucocitos (células blancas) y plaquetas (trombocitos), suspendidos en el plasma sanguíneo. Los eritrocitos de la sangre pueden ser separados por centrifugación (CRS) o sedimentación, de los demás elementos de la sangre (**Figura 14**). La sangre es un fluido no newtoniano de perfil parabólico y flujo pulsátil (ley de Poiseuille y flujo laminar) que circula unidireccionalmente en los espacios vasculares.

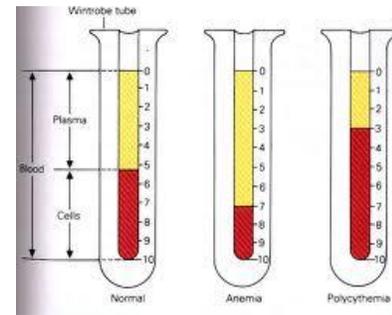


Fig. 14. Separación de eritrocitos y células sanguínea para determinar el hematocrito.

El adulto tiene alrededor de 4-5 litros de sangre (7% de peso corporal), a razón de unos 65 a 71 mL de sangre por kg de peso corporal. El porcentaje del volumen de CRS se conoce como Hematocrito, el volumen varía bajo diferentes condiciones, siendo mayor en sangre venosa que la arterial. Antes de la introducción de las unidades SI, a la fracción de volumen de eritrocitos (FVE) se le denominaba hematocrito, y se reportaba como porcentaje, actualmente se reporta como una fracción decimal, siendo el valor el mismo (OPS, 1983). La fórmula para calcular el hematocrito es:

$$\frac{\text{CRS}}{\text{Volumen total de sangre}} \times 100 = \% \text{ de hematocrito ó fracción decimal}$$

5.viii. Hemoglobina

El contenido principal del eritrocito es la hemoglobina (Hb), la cual representa un tercio de la masa de la célula. Durante la eritropoyésis la producción de hemoglobina es del 65% y el 35% restante en etapa de reticulocito. La molécula de

hemoglobina está constituida por una molécula de globina y 4 grupos heme; cada grupo heme contiene un átomo de hierro.

Cuando la molécula se satura de oxígeno se denomina oxihemoglobina, lo que le da un color rojo brillante a los eritrocitos; cuando se disocian y se reducen las moléculas de oxígeno en los tejidos periféricos y pasa reducida la hemoglobina a la sangre venosa, se ven de un color rojo oscuro (Rhoades y Pflanzler, 1992).

La fracción de volumen de eritrocitos (hematocrito), normalmente es mayor unas 0.003 veces que la concentración de hemoglobina cuando esta se expresa en gramos por litro. Si la concentración de hemoglobina se expresa en milimol de hemoglobina (Fe) por litro, la fracción del volumen de eritrocitos será más o menos 0.005 veces mayor que la cifra obtenida (OPS, 1983). Las fórmulas para obtener estos valores son:

Cuando se expresa en gramos de Hb por litro:

$$\text{VOLUMEN DE ERITROCITOS (mL)} \times 0.003 = \text{Hb g/L}$$

Cuando se expresa en milimoles (Fe) de Hb por litro:

$$\text{VOLUMEN DE ERITROCITOS (mL)} \times 0.05 = \text{Hb mmol/L}$$

6. MECANISMOS OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES DE LA SANGRE Y EL ERITROCITO

El eritrocito es una célula con una alta especialización bioquímica, como es el transporte de oxígeno a los tejidos. 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 (Cañas y cols., 1988), incluyendo su almacenamiento en paquetes sanguíneos (Baek y cols., 2012). La destrucción de los eritrocitos por eriptosis 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 eriptosis también puede iniciarse por infecciones, enfermedades metabólicas, deficiencias de glucosa 6 fosfato deshidrogenada, intoxicación por metales, y el propio envejecimiento celular. 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 eritropoiesis 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 alterno ejercido por eritrocitos y plaquetas, ya que por medio de sus sistemas antioxidantes intracelulares, proporcionan un mecanismo adicional de defensa (Quintanar y Calderón, 2006).

Se ha demostrado que los eritrocitos presentan un sistema antioxidante muy eficiente constituido por altos niveles de las enzimas catalasa (CAT) (Cañas y cols., 1988; Aebi y cols., 1968) y relativamente menores niveles de superóxido dismutasa (SOD) (Lynch y cols., 1976), y los componentes del ciclo del glutatión (Van Asbeck y cols, 1985). Adicionalmente, la membrana del eritrocito contiene un canal aniónico por el que puede pasar el superóxido ($O_2^{\cdot-}$); este radical en la membrana celular es poco permeable, el anión superóxido en el interior del eritrocito es transmutado por la SOD intracelular para formar agua oxigenada (H_2O_2).

La capacidad del eritrocito para metabolizar ERO fue demostrada utilizando H_2O_2 , al ser metabolizado, inhibe la generación del radical libre hidroxilo (HO^{\cdot}) y HOCl. Los eritrocitos expuestos a oxidantes se adhieren preferentemente a las células endoteliales, debido a posibles modificaciones en su membrana (Wali, 1987). La gran adherencia de los eritrocitos a la superficie endotelial y su localización en el ambiente oxidante podría significar que el eritrocito funciona como un filtro para el exceso de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . En consecuencia previene la formación de especies reactivas más tóxicas como son el HO^{\cdot} y el HOCl (Winterbourn y Stern, 1987).

Por otro lado existen una gran variedad de frutas capaces de inhibir el estrés oxidativo y la formación de radicales libres (Edwards y cols., 2012; Middleton y cols., 2000), obtenidos de extractos etanolicos de plantas (Salawu y cols., 2011; Nugraheni y cols., 2011), incluso el efecto inhibitorio de la hemolisis en los eritrocitos por extractos de la planta de cocoa (Zhu y cols., 2002, Zhu y cols., 2005), de la cáscara de la papa (Singh y Rajini, 2008) y de aceite de semilla (Liu y cols., 2012). Esta protección ha sido relacionada a la presencia de flavonoides (Lam y cols., 2007; Asgary y cols., 2005) que protegen la membrana del eritrocito contra la deformación.

7. MÉTODOS PARA EVALUAR EL ESTRÉS OXIDATIVO

A pesar de que se han propuesto varios marcadores para evaluar el estrés oxidativo, 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 (Naito y cols., 2010) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Técnicas utilizadas para determinar estrés oxidativo.			
Técnica	Elementos detectados		Área de aplicación
Resonancia por captación de electrones (ESR)	Superóxidos	$O_2^{\cdot-}$	Biofísica molecular
Resonancia de spin de electrones (EPR)	Radicales hidroxilo	HO^{\cdot}	
	Monóxido de Nitrógeno	NO^{\cdot}	
Cromatografía de líquidos (HPLC)	MDA		Bioquímica
(ELISA)	MDA		Bioquímica
Espectroscopia de masa (MS)	Superóxidos	$O_2^{\cdot-}$	Biofísica molecular
	Radicales hidroxilo	HO^{\cdot}	
	Monóxido de Nitrógeno	NO^{\cdot}	
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

7.i. Técnica de TBARS

La técnica de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) se utiliza para determinar sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y monitorear la peroxidación lipídica, que representa los niveles de malondialdehído (MDA), que es un producto final, de bajo peso molecular, de la lipoperoxidación (Schuh, 1975), siendo el mayor indicador de estrés oxidativo (Janero, 1998; Callaway, 1998).

Debido a que hay otras fuentes de malondialdehído, esta técnica no es completamente específica para la peroxidación de lípidos. Pero, es ampliamente utilizada para determinar y monitorear la actividad de sustancias oxidantes y antioxidante en drogas, productos alimenticios y tejidos biológicos de humanos y de animales (Janero, 1998; Callaway, 1998). Se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del compuesto malondialdehído, formando TBA-MDA, que es un cromóforo rojo-rosado (**Figura 15**).

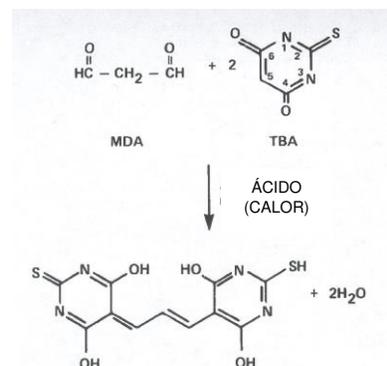


Fig. 15. Reacción del Malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico.

Su aplicación en biomedicina es ampliamente utilizado para monitorear a diferentes enfermedades en suero, plasma y células sanguíneas (Villa-Caballero, 2000) y como auxiliar de diagnóstico clínico (Armstrong, 1994; Estepa y cols., 2001). Los tejidos y muestras biológicas contienen productos libres derivados del estrés oxidativo, como los hidroperóxidos lípidos y aldehídos (MDA), que reaccionan con el TBARS formando aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción UV o por fluorimetría. TBARS regresa a sus niveles normales cuando se aplican antioxidantes (Kwon, 1964). La técnica de TBARS es de elección para determinar y monitorear la peroxidación lipídica, siendo el mayor indicador de estrés oxidativo (Janero, 1998; Callaway, 1998).

8. ANTIOXIDANTES NATURALES

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 (Willet, 1994; Torres-Oquendo y cols., 2011). En la **Tabla 12** se resumen los principales tipos y familias de antioxidantes en la naturaleza y que el ser humano consume.

Tabla 12. Algunos tipos de antioxidantes en la naturaleza.

	ANTIOXIDANTES NATURALES	TIPO DE ESTRUCTURA	FUNCIONES	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	TIPOS	ASOCIADOS A	SUBTIPO Metabolito secundario
Actividad antioxidante de las fracciones polares y no polares	FLAVONOIDES (son metabolitos de medio o bajo peso molecular)	Fenólica o polifenólica (estructura aromática) Más polar y solubles en metanol	Depuración de radicales libres Quelatación de iones metálicos (hierro y cobre) Inhibición de enzimas oxidantes Antiperoxidación	Antibacterianos Antitrombótica Vasodilatadora Antialérgica Antiéstrógena Antiinflamatoria Anticarcinogénica	Flavonoles Flavonas Isoflavonas Flavonoles Chalconas Antocianinas (son cientos)	Glucósidos de glucosa, galactosa y monosacáridos	Aglicones de antocianinas y Antocianidinas
	Carotenoides (cáscara)	Fitoestrógenos Estructura lineal. No polar solubles en n-hexano		Antiosteoporosis	Carotenos	Provitamínicos No provitamínicos	α -caroteno β -caroteno λ -caroteno Licopeno Fitoeno Fitoflueno
	Tocoferoles	Estructura lineal. No polar solubles en n-hexano Oligoelemento				Xantófilas Vitamina E ó Alfa-tocoferol	Provitamínicos No provitamínicos

8.1. 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 tomate que disminuye los niveles de malondialdehído y por lo tanto la lipoperoxidación (Valero y cols., 2011). Extractos de manzana con alto contenido de polifenoles flavonoides, inhiben la lipoperoxidación en plasma humano (Lotito y Frei, 2004; Mangiapane, 1992). El té verde contiene alto contenido de flavonoides (catequinas) y actúa como antioxidante en la membrana del eritrocito evitando la oxidación de la Hb de la membrana plasmática (Coimbra y cols, 2006).

8.2. Flavonoides: Polifenoles

Los fenoles son un grupo de compuestos no esenciales en la dieta, pero su bioactividad está relacionada con su capacidad de quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y la de neutralizar los radicales libres. Los antioxidantes polifenólicos se encuentran comúnmente en vegetales, pero sus concentraciones son más altas en las frutas. Los Polifenoles pueden actuar como antioxidantes mediante la depuración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y mediante la quelación de iones metálicos de transición con actividad redox. También pueden tener un efecto antioxidante indirecto por la inhibición de enzimas pro-oxidantes e inducción de enzimas antioxidantes. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides pueden conferir protección contra el daño oxidativo a tejidos, células y constituyentes del plasma (Coimbra y cols., 2006).

8.2.i Estructura molecular. Los Flavonoides presentan complejas y variadas estructuras fenólicas (Middleton y cols., 2000) (Figura 16). Más de 4000 estructuras se han identificado en plantas (Harborne, 1988). Se consumen regularmente un promedio de 23 mg/día, siendo más fácilmente absorbidos por el humano los flavonoides glicosilados que las agliconas. (Elhabiri y cols., 1977). Los flavonoides (*flavus* = amarillo) se encuentran en las plantas y vegetales y son responsables del color de frutos y hojas. Estas sustancias de bajo peso molecular son fenil-benzo-pironas (fenilcromonas), con una variedad de estructuras basadas en un núcleo común de tres anillos con varias sustituciones.

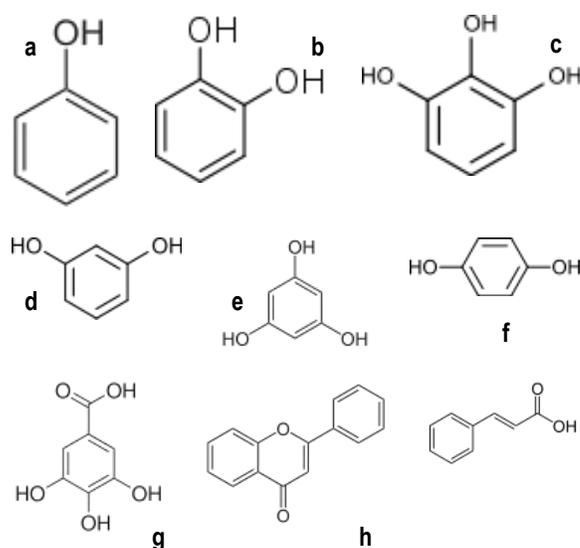


Fig. 16. La estructura básica de los flavonoides está dada por su anillo fenol (a), y de acuerdo al número de anillos y radicales OH se forman otro tipo de flavonoides polifenólicos, (b) pirocatecol, (c) pirogalol, (d) resorcinol, (e) floroglucinol, (f) hidroquinona, (g) ácido gálico, (h) flavona, (i) ácido cinámico.

Los flavonoides se subdividen de acuerdo a la presencia de un grupo oxígeno en la posición 4, una doble unión entre los átomos de carbono 2 y 3, o un grupo hidroxilo en posición 3 C del anillo (medio) (**Figura 16, 17 y 18**). Estas características parecen ser necesarias para su mejor actividad en diferentes sistemas estudiados, especialmente antioxidante y antiproliferativa (Middleton y cols., 2000).

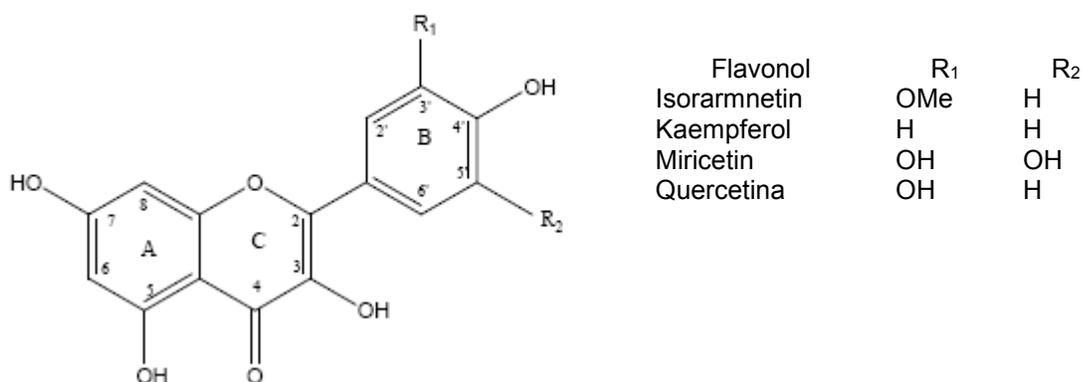


Fig. 17. Estructura química de flavonoles (quercetina, kaempferol, myricetina, isorhamnetina).

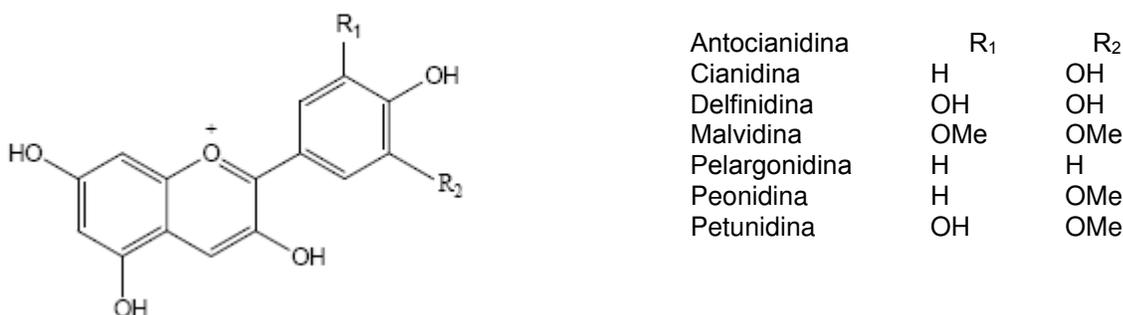


Fig. 18. Estructura química de antocianidinas (cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina).

Los flavonoides son típicos compuestos fenólicos y por lo tanto actúan como potentes quelantes de metales y radicales libres, siendo potentes antioxidantes. De igual manera se han utilizado para tratar el alcoholismo, enfermedades cardiovasculares y muchas enfermedades crónico degenerativas, metabólicas y sus secuelas, así como propiedades anti-edad (Middleton y cols., 2000). En el caso del tejocote del género *Crataegus mexicana*, no se conoce la composición de los polifenoles, ni se ha medido su capacidad antioxidante utilizando eritrocitos.

Su absorción en el organismo se debe a una ruptura de sus anillos por efecto de los microorganismos intestinales, produciendo una demetilación y dehidroxilación de los ácidos fenólicos (derivados del ácido cinámico y fenoles simples), los microorganismos intestinales también poseen glicosidasas capaces de romper los flavonoides glicosilados en azúcares residuales. Los flavonoides también participan en las reacciones de oxidación y reducción (Redox), como en la metilación, glucoronidación y sulfonación. Por lo anterior, su absorción puede ser limitada y su detección en plasma también, ya que pueden ser degradados a sus subproductos. La aglicona diosmetina y quercetina pueden ser detectadas en plasma, pero no en orina, por lo que estos metabolitos también sufren degradación en hígado y posiblemente en otros órganos. De esta manera, es más conveniente suplementar una dieta con flavonoides glicosilados que con agliconas.

Sin embargo, también se han observado reacciones adversas, las cuales son muy raras. Salama y Mueller (1987), en un estudio con seis individuos que se les administró catequina y sus metabolitos, éstos se unieron fuertemente a la membrana del eritrocito, generando nuevos sitios antigénicos, con la consecuente producción de auto-anticuerpos y producción de anemia hemolítica, desapareciendo al suprimir la catequina y consumir otros metabolitos.

Los efectos de los flavonoides en el sistema enzimático de las células animales ha sido documentado por varios investigadores (Middleton y cols., 2000). Dentro de estos efectos tenemos los siguientes:

- a. Kinasa.- La proteína quinasa C (PKC) y la proteína tirosina quinasa (PTK) son inhibidas *in vivo* por ciertos flavonoides como la quercetina.
- b. Fosfolipasa A₂.- Es inhibida por la quercetina, quercetagenina, caemferol y escutellareina.
- c. ATPasa.- La quercetina inhibe el transporte de Ca²⁺ a través de la membrana del eritrocito.
- d. Lipo-oxigenasa y ciclo-oxigenasa. Algunas benzoquinonas y flavonoides como

la baicaleina inhiben estos sistemas quelando la lipo-oxigenasa.

- e. Adenil ciclasa, transcriptasa, glutatión S-transferasa, hialuronidasa, aldehído y alcohol deshidrogenadas, amilasa, ADN y ARN polimerasa, citocromo P450, son inhibidas por flavonoides de diferentes tipos.
- f. Linfocitos, células NK, macrófagos y monolitos, mastocitos y basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas, células endoteliales, células musculares y cardiacas, células nerviosas.- Los flavonoides actúan como potentes antioxidantes en estas células.
- g. Efectos endócrinos y metabólicos.- Los flavonoides actúan inhibiendo o incrementando el efecto de las hormonas.
- h. Efectos antivirales.- Quercetina, morina, rutina, taxifolina, apigenina, catequina, entre otros tienen efecto antiviral, incluyendo el VIH.
- i. Efectos antitóxicos, hepatoprotectores y citoprotectores.- Silimarín protege contra la peroxidación lipídica y hemólisis en eritrocitos de rata, también disminuye la actividad de la SOD en eritrocitos de pacientes alcohólicos.
- j. Actividad antioxidante.- Las ERO pueden ser depuradas e inhibidas por la vitamina A, E y β -caroteno que son excelentes antioxidantes, así como un gran número de flavonoides.

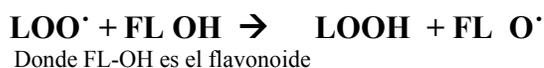
8.2.ii. Estructura-función de los flavonoides. Debido a su composición molecular los flavonoides pueden funcionar como: 1) agente reductor y quelante de metales, 2) inhibidor de las ERO, 3) como antioxidante rompiendo la cadena de oxidación, 4) evita la formación del oxígeno singulete, y 5) protector del ácido ascórbico, que a su vez protege a los flavonoides contra la degradación oxidativa. Es obvio que los flavonoides reaccionan con el OH, y rompen la cadena de oxidación, siendo muy importantes en la conservación de los tocoferoles en las membranas biológicas.

En todos estos casos la quercetina parece ser un eficiente inhibidor de radicales libres, siendo la miricetina aún más activa. El Kaemferol es muy buen depurador, aún con un solo grupo hidroxilo. La catequina, es un inhibidor débil (Alexandrakis y cols., 1999; Middleton y cols., 2000).

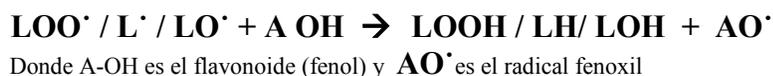
8.2.iii. Inhibición de la lipoperoxidación por acción de los flavonoides.

Se ha reportado que la peroxidación lipídica puede ser inhibida por los flavonoides, actuando como un fuerte inhibidor del O^{-2} (Baumann y cols., 1980) y atrapador de 1O_2 (Sorata y cols., 1984). Parece que O^{-2} por si solo, no es capaz de iniciar la lipoperoxidación, siendo el HO^{-2} (la forma protonada de O^{-2}) la que aparentemente lo hace en los ácidos grasos polinsaturados aislados. El papel del O^{-2} parece ser menor en la lipoperoxidación. La iniciación de la lipoperoxidación parece ser iniciada por el OH y radicales metálicos libres (como es el perferril y el ferril) (Halliwell y Gutteridge, 1990) (**Figura 3**).

La peroxidación lipídica podría ser detenida en su estado de iniciación, inhibiendo los radicales libres, mientras que la cadena de propagación puede ser interceptada por inhibidores de radicales peroxilo (PL) como son los antioxidante fenólicos. La reacción antioxidante que rompe la cadena de peroxidación por acción de los flavonoides (F), puede ser representada como sigue:



La fase de terminación del radical lipídico (L^{\bullet}), del radical lipoperóxido (LOO^{\bullet}), y del radical alcoxil (LO^{\bullet}) (formado por la reiniciación de la peroxidación lipídica e inducida por iones metálicos), todos ellos por antioxidantes fenólicos, se puede representar de la siguiente manera:



También se ha propuesto que los flavonoides reaccionan con los radicales lipoperoxidos (LOO^{\bullet}) permitiendo terminar la reacción en cadena de los radicales libres. La oxidación de quercetina y rutina por los radicales de peróxido de laurel, es sugerente de dicho mecanismo de terminación (Takahama, 1983). Como cualquier molécula rica en electrones, los flavonoides pueden presentar autooxidación. Tal es el caso de la quercetina y miricetina (que presentan catecol y pirogalol en el anillo B respectivamente, en soluciones acuosas a un pH de 7.5. La

autooxidación genera la producción de $O^{\cdot-}$, H_2O_2 , y OH . Dichos efectos prooxidantes son de interés en el contexto de su capacidad de citotoxicidad (Canada y cols., 1990).

8.2.iv. Inhibición de la lipoperoxidación en la membrana del eritrocito por acción de los flavonoides. Los flavonoides pueden inhibir al OH e impedir la peroxidación lipídica por fotohemólisis, como es el caso de la quercetina y la rutina, que se ha demostrado su potencial inhibitorio en diferentes modelos y sistemas biológicos como en los eritrocitos (Sorata y cols., 1984, 1988). De igual manera las isoflavonas de la soya inhiben la LO y previenen la hemólisis peroxidativa en los eritrocitos de rata, conejo y oveja (Naim y cols., 1976), y también en el ser humano (Asgary y cols., 2005).

Singh y Rajini (2008) utilizaron el extracto de cáscara de papa, rico en los polifenoles ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogénico y ácido caféico, inhibiendo el efecto oxidativo del H_2O_2 y del $FeSO_4$ en la membrana del eritrocito visto con microscopio electrónico de barrido y disminuyó la lisis observada en geles de electroforésis. Lam y cols. (2007) demostraron el efecto antioxidante y anti-hemolítico del 6-gingerol, rapontin, aloe-emodin y barbaloin, inhibiendo de manera sinérgica la lipoperoxidación de la membrana de eritrocitos de rata. Liu y cols. (2012) determinaron el efecto antioxidante de aceites de grano de girasol, reduciendo el estrés oxidativo y por consiguiente la deformación y simetría de la membrana del eritrocito con presencia de menor cantidad de acantocitos, y la inhibición de burbujas o bebbing de la superficie externa de la membrana celular expuestas a una alta concentración de glucosa, posiblemente inhibiendo la externalización de fosfatidilserina.

Los efectos de la cocoa para inhibir la formación de radicales libres, por medio de flavonoles y oligómeros de procianidinas como la catequina y epicatequina, ha sido demostrado por Zhu y cols. (2002, 2005). Estos flavonoles inhibieron la hemólisis inducida por AAPH en eritrocitos de rata, posiblemente por la unión de los flavonoides por fuerzas electrostáticas sobre los puentes de hidrógeno, a la porción polar de los fosfolípidos.

XV. ANTECEDENTES

1. EL TEJOCOTE (*Crataegus mexicana*) COMO ANTIOXIDANTE

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 (Nieto, 2007; Nieto y Borys, 2008). Conocer las propiedades y 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 (Cabrera, 1992); similar al nombre que le dieron al manzano este mismo grupo étnico, llamándolo *texococuahutl* (Nieto y Borys, 1993). El nombre científico de la variedad que nos interesa en este trabajo es *Crataegus mexicana* (Nuñez-Colín y cols., 2011).

Se produce del árbol de tejocote que mide de 5 a 10 m, sus hojas son semiperennes, 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 (**Figura 20**).



Fig. 20. Frutos de tejocote.

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 (Argueta y Cano, 1994; López-Santiago, 2008). En inglés se denomina Hawthorn o mexican wild crabapples.

II.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 (López-Santiago, 2008).

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 (Phipps, 1997), 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 (Nieto y Borys, 2008) (**Figura 21**). 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 (López-Santiago, 2008).



Fig. 21. Distribución geográfica en México del teocote.

II.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 (Phipps y cols., 2003), lo cual ha provocado serios problemas de identificación y homonimias (Nuñez-Colín y cols., 2011). En base a los estudios de Eggleston (1909), Phipps y cols. (1990), Phipps (1997), McVaugh (2000) y Phipps y cols. (2003), la taxonomía más actual del género para ejemplares mexicanos se describe en la **Tabla 13 y 14**. En México, el nombre más común para el género *Crataegus* es el “Tejocote”, en especial para *Crataegus mexicana*.

II.3. Etnobotánica. Usos y aplicaciones del tejocote en enfermedades.

Existen evidencias de que los frutos del *Crataegus* ya eran aprovechados y consumidos por los humanos desde 7,000 años a. de C. en Turquía y Siria. El fruto, la raíz y las hojas del tejocote se emplean para aliviar diversas enfermedades en el ser humano.

Tabla 13. Clasificación taxonómica del género *Crataegus*.

Serie	Subespecie	Sinonimia	Localización Geográfica
1. <i>Parvifoliae</i>	1. <i>C. uniflora</i>		Tamaulipas
2. <i>Mexicanae</i>	2. <i>C. mexicana</i>		Estado de México, Hidalgo, Puebla, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Veracruz
	3. <i>C. stipulosa</i>	<i>C. mexicana</i>	Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Veracruz
	4. <i>C. nelsoni</i>		Chiapas
3. <i>Crus-galli</i>	5. <i>C. gracilior</i>		Hidalgo, Puebla, Tamaulipas, Estado de México, Veracruz, San Luis Potosí, Oaxaca, Michoacán
	6. <i>C. rosei</i>	<i>parryana</i>	Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Hidalgo
		<i>rosei rosei</i>	Chihuahua, Coahuila, Nayarit, Durango, Guanajuato, León, Hidalgo, Tamaulipas, Nuevo Sinaloa, Queretaro, San Luis Potosí
		<i>rosei mahindae</i>	Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí
4. <i>Madrenses</i>		<i>rosei amoena</i>	Coahuila, Nuevo León
	7. <i>C. tracyi</i>	<i>tracyi</i>	Texas, EUA
		<i>coahuilensis</i>	Coahuila
		<i>madrensis</i>	Coahuila y Nuevo León
	8. <i>C. aurescens</i>		Coahuila y Nuevo León
5. <i>Greggianae</i>	9. <i>C. greggiana</i>	<i>Greggiana</i>	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Texas, EUA
		<i>Pepo</i>	Coahuila y Nuevo León
	10. <i>C. serratissima</i>		Hidalgo y probablemente Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León
	11. <i>C. sulfúrea</i>		Coahuila y Nuevo León
	12. <i>C. grandifolia</i>	<i>grandifolia potosina</i>	Coahuila Nuevo León
6) <i>Baroussanae</i>	13. <i>C. baroussana</i>	<i>Baroussana jamensis</i>	Coahuila y Nuevo León Coahuila
	14. <i>C. cuprina</i>		Nuevo León
	15. <i>C. johnstonii</i>		Coahuila

Tabla 14. Clasificación Botánica del Tejocote *Crataegus mexicana*.

Superreino	<i>Eukaryota</i>	Orden	Rosales
Reino	<i>Plantae</i>	Familia	Rosaceae
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	Subtribu	<i>Pirinea</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>	Subfamilia	<i>Maloideae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	Género	<i>Crataegus</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>	Especie	<i>C. mexicana</i>

El género *Crataegus* se ha descrito en farmacopeas muy antiguas, se utiliza como una alternativa para el tratamiento de diversas condiciones cardiovasculares, incluyendo angina, arritmias e hipertensión arterial sistémica (HAS) (Rigelsky y Sweet, 2002). Lind mostró una disminución en la presión diastólica y sistólica en pacientes con hipertensión arterial después de tres meses de tratamiento con extracto hidroalcohólico de *Crataegus curysipala* (Asgary y cols., 2004). También se han encontrado fracciones inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el extracto de metanol de frutos frescos de *crataegus sp* (Inokuchi y cols, 1984).

El fruto hervido es un remedio tradicional en México para prevenir enfermedades del aparato respiratorio como la tos, bronquitis, pulmonía, resfrío, congestión del pecho y dolor del pulmón. Las hojas y flores en infusión (té) se utilizan en padecimientos de los riñones, para adelgazar ya que es un excelente diurético y limpia las vías urinarias, modera las contracciones en caso de taquicardia y es un excelente antiespasmódico; la raíz y corteza se utilizan como excelentes antiespasmódicos (Argueta y Cano, 1994). Algunas especies de *Crataegus* en Europa y China se utilizan como remedio para enfermedades cardíacas, sobre todo por su efecto cardiotónico que sirve para estabilizar la presión arterial (Nieto y Borys, 2008; Özcan y cols., 2005) (**Tabla 15**). Frutos y flores del género *Crataegus* presentan antioxidantes, entre ellos los ácidos epicaténico y clorogénico (Özcan y cols., 2005; Peschel y cols., 2008).

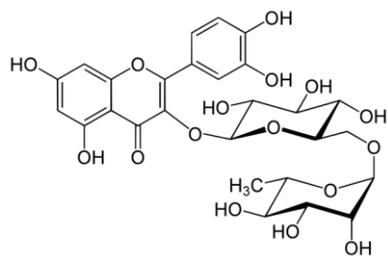
II.4. Composición Fitoquímica

Existen pocos trabajos en lo referente a la composición y contenido de metabolitos secundarios antioxidantes de *Crataegus mexicana*, posiblemente por la gran variedad de especies de tejocote en México (**Tabla 16**).

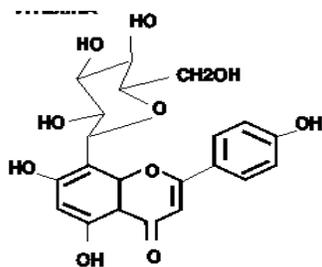
Tabla 15.- Especies del género *Crataegus* que se emplean en el tratamiento de diferentes padecimientos.

ESPECIE	PAÍS DE USO	PROPIEDADES Y USOS	EXTRACTOS ESTUDIADOS Ó UTILIZADOS
<i>C. aronia</i> (Ljunbuncic y cols., 2005)	Israel	Enfermedades cardiovasculares, diabetes, antioxidante, cáncer, actividad	Extracto acuoso, hojas y frutos.
<i>C. tanacetifolia</i> (Celebi y cols, 2006)	Alemania Turquía	Insuficiencia cardiaca, reduce los niveles de colesterol	Extracto acuoso, hojas.
<i>C. laevigata</i> (Kirakosyan y cols., 2004)	Alemania	Insuficiencia cardiaca severa	Extracto MeOH, hojas flores y frutos.
<i>C. pinnatifida</i> (Min y cols., 2004)	Corea, China, Japón	Malestares gástricos, diarrea, reducción de triglicéridos en la sangre	Extracto MeOH, frutos maduros.
<i>C. oxycantha</i> (Miller, 1998; Long y cols, 2006)	Alemania, Suiza, China	Insuficiencia cardiaca, antioxidante, anti-inflamatorio, digestivo, estimulante cardiaco, agente hipotensivo, arritmias, diurético, antihipertensión	Extracto EtOH, hojas y frutos.
<i>C. monogyna</i> (Urbonaviciute, y cols., 2006)	Lituania	Antioxidante, enfermedades cardiacas, vasodilatador, hipotensivo	Extracto EtOH, hojas, flores y frutos.

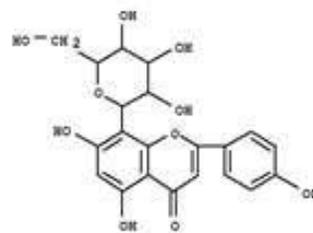
Sin embargo, en las hojas, frutos, raíces y cortezas de otras variedades medicinales de *Crataegus* se han encontrado diversos metabolitos secundarios (**Figura 22**), tales como flavonoides (estructuras 1 a 4), procianidinas oligoméricas de flavanoles, ácidos fenólicos (estructura 5 y 6), ácidos triterpénicos (estructuras 7 y 8), ácidos orgánicos y esteroides (estructura 9 y 10), epicatequina (estructura 11) y catequina (estructura 12). También contienen una cantidad importante de pectinas, resinas y taninos (Argueta y Cano, 1994; Özcan y cols., 2005; Peschel y cols., 2008). Recientemente, en estudios de la fruta del tejocote realizados en variedades genéticas de Asia, Europa y Asia, se ha demostrado la presencia de terpenoides, polifenoles (catequinas –principalmente epicatequina-, proantocianidinas poliméricas y oligoméricas como la procianidina dimérica B₂, cianidina-3-O-galactósido, idaeín y ácido clorogénico) y flavonoides (flavonol-O-glicosido como la quercetina-3-O-galactosido (hiperósido), vitexina-2"-O-ramnosido, acetilvitexin-2"-O-ramnosido, flavona-C-glicosido, e hiperósido (Froehlichera y cols., 2009; Shao-Jiang y cols., 2011; Çalışkan y cols., 2012; Edwards y cols., 2012).



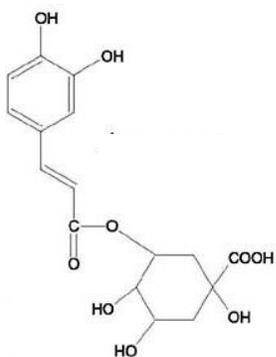
1. Rutina



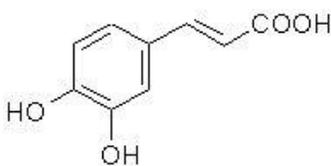
3. Vitexina



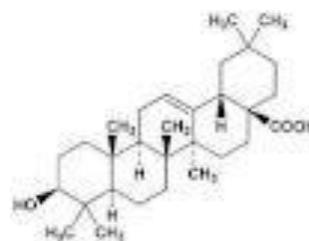
4. Ramnósido de Vitexina



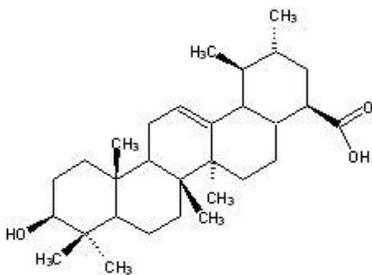
5. Ácido clorogénico



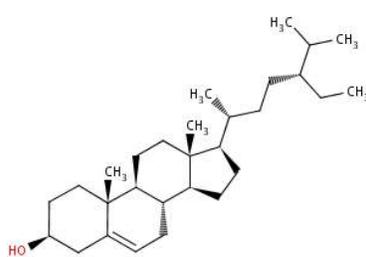
6. Ácido cafeico



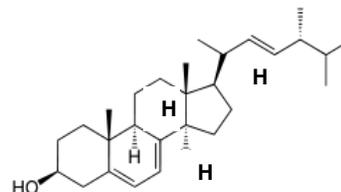
7. Ácido oleanólico



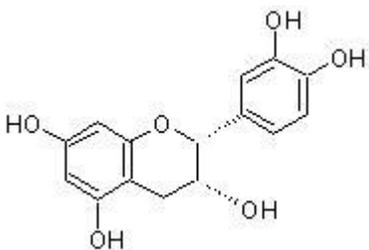
8. Ácido ursólico



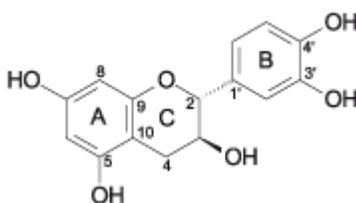
9. β - sitosterol



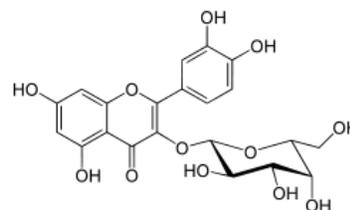
10. Estigmasterol



11. Epicatequina



12. Catequina



2. Hiperósido

Fig. 22.- Estructura química de algunos compuestos del género *Crataegus*.

Los frutos del género *Crataegus* son muy apreciados por su contenido de vitamina C, carotenos y sales minerales como el calcio, fósforo y hierro, además de que presenta un alto contenido de pectina (Higareda y cols., 1995) y azúcares (Franco–Mora, 2010).

Tabla 16.- Composición y contenido de metabolitos secundarios en el tejocote *Crataegus mexicana*.

	Higareda, 1995	Ozcan, 2005	Nieto, 2007	Peschel, 2008	Franco, 2009	Luna, 2010	USDA, 2011	Méndez, 2013
Carotenoides								26.4±0.02 µg/g
Polifenoles totales				X	8.1-22.3 mg ác. tánico	26.13-35.36 mg ác. gálico		2.65±0.23 µg/g ác.gálico
Flavonoides								
Flavones								
Apigenin							0.40	
Luteonin							0.0	
Flavonoles								
Kaempferol							0.0	
Myricetin							24.10	
Ácido málico			0.99-2.85		1-6%			
Ácido epicaténico		X						
Ácido clorogénico			X					
Vitamina C	X							
Sales minerales	P, Ca, Fe							
Glucosa			10.5 %		64-120 mg			

De Acuerdo a la **Tabla 17** de valores nutritivos de los alimentos (Pérez y cols., 2009) el contenido nutricio del tejocote aporta por cada 70 g lo siguiente:

PESO BRUTO g	PESO NETO g	ENERGÍA kcal	ENERGÍA KJ	PROTEÍNA g	LÍPIDOS g	HIDRATOS DE CARBONO g	FIBRA g	VITAMINA A (ug RE)	ÁCIDO ASCÓRBICO mg	HIERRO NO HEM (mg)	AGUA (MI)
70	60	52	216	0.5	0.4	13.1	1.6	251.1	27.4	1.0	44.4

II.4.i. Carotenoides

Existe la presencia de carotenoides en extractos de tejocote. Se han identificado con las técnicas de IR, RMN, ¹H, ¹³C y espectrometría de masas, la presencia de β-caroteno (Méndez y cols., 2013).

II.4.ii. Polifenoles

El contenido total de compuestos fenólicos en *C. mexicana* con actividad antioxidante varía de acuerdo a diferentes autores (Franco–Mora, 2010; Luna, 2010; Méndez y cols., 2013). La base de datos de la USDA (Estados Unidos de América), sobre flavonoides en alimentos, reporta el contenido de metabolitos en las hojas de tejocote y la raíz (no determina la familia), como los flavones, Apigenina (promedio 0.40) y Luteolina (promedio 0.0). La presencia de flavonoles, como Kaempferol (promedio 0.0), Miricetina (promedio 0.0) y quercetina (promedio 24.10) (USDA database for flavonoid content in selected alimnts, 2011 (Skegret y cols., 2005).

II.4.iii. Datos del laboratorio de Nutrición de la UAT

En el laboratorio de química de la nutrición de la escuela de Nutrición de la UAT, se ha evaluado la concentración de carotenos y polifenoles (flavonoides) en los extractos de tejocote (*Crataegus mexicana*) (Tabla 18).

Tabla 18. Presencia de Carotenos en frutos de la región de Tlaxcala.

Fruto	Antioxidante	Contenido en epidermis		Contenido en epidermis ^a
Tejocote (<i>Crataegus m</i>)	Carotenos	26.44 ug/g	Polifenoles	2.37 mg
Durazno		15.41 ug/g		0.37 mg
Pera paraíso		6.23 ug/g		0.28 mg
Ciruela (<i>Pronus d</i>)		5.73 ug/g		
Manzana doble rojo		2.84 ug/g		1.74 mg
Manzana California		2.04 ug/g		

^a = Contenido equivalente en mg de ácido gálico/g de peso

El tejocote fue el fruto con mayor contenido de carotenos y polifenoles totales. De estos trabajos de investigación, se demostró la acción antioxidante del tejocote con extractos de acetona y metanol de la cáscara de tejote (Tabla 19).

Tabla 19. Determinación de la Actividad Antioxidante del Tejocote (*Crataegus mexicana*) con DPPH y TBARS, así como su IC₅₀

Menor Polaridad	Extracto de:	g obtenidos	AO / μ M Trolox	AO /DPPH 100ppm	IC ₅₀	AO /TBARS 100ppm	IC ₅₀	
-	n-hexano	7.32	11.3	7.43		4.69		
	Diclorometano	15.00	12.5	18.53		11.01		
	Acetato de etilo ^a	8.50	16.6	41.46		37.21		
	+	Acetona ^a	6.22	17.1	91.56	15.26	80.84	16.78
		Etanol ^b	10.00	17.1	75.46	54.20	68.94	54.49
		Metanol ^b	15.00	17.1	87.83	26.64	66.08	27.66
Mayor Polaridad								

AO = Actividad Antioxidante
 IC₅₀ = Porcentaje de reducción del oxidante
^a = Presencia de carotenoides
^b = Presencia de polifenoles y azúcares

III. JUSTIFICACIÓN

Muchos de los problemas metabólicos que aquejan a la población están relacionados con el proceso de estrés oxidativo. Existe evidencia sobre el daño que ocasiona la oxidación a diversas células en condiciones patológicas, lo que tiene un impacto en la membrana y el citoesqueleto de la célula, alterando la fisiología, morfología y su vida media. Por lo que es necesario considerar opciones de antioxidantes de origen natural que contrarresten dichos cambios, ya que los sintéticos podrían causar efectos tóxicos colaterales. Para eso los eritrocitos son un buen modelo biológico para el estudio sobre el daño oxidativo.

Considerando que existen en la naturaleza compuestos antioxidantes que podrían inhibir estos procesos patológicos, es importante determinar su actividad antioxidante. En el caso del tejocote (*Crataegus mexicana*) es una fruta con características fenotípicas específicas y del cual se desconocen sus propiedades antioxidantes en sangre y principalmente en la membrana celular del eritrocito.

IV. HIPÓTESIS

Los antioxidantes derivados de extractos de polaridad media de tejocote (*Crataegus mexicana*) inhiben la lipoperoxidación en la membrana citoplasmática de eritrocitos de seres humanos *in vitro* posiblemente por su contenido de metabolitos polifenólicos.

V. OBJETIVOS

V.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in Vitro* la capacidad de inhibición de la lipoperoxidación en la membrana citoplasmática de eritrocitos de seres humanos por extractos de tejocote (*Crataegus mexicana*).

V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto orgánico de la fracción de acetona de la epidermis liofilizada de tejocote.
2. Cuantificar el porcentaje de inhibición de lipoperoxidación en la membrana citoplasmática de eritrocitos humanos con el extracto de acetona a diferentes concentraciones.
3. Determinar los cambios morfológicos, cinéticos y el proceso de eritosis de los eritrocitos humanos con el extracto de acetona a diferentes concentraciones y en ausencia del extracto.
4. Determinar las diferencias moleculares por medio de electroforésis de las proteínas de membrana en células fantasmas con el extracto de acetona a diferentes concentraciones y en ausencia de extracto.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Materiales

El material y equipo a emplear fué facilitado por el Laboratorio de Investigación en Química de la Nutrición de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx).

VIII.1.1. Agentes químicos y soluciones para TBARS. Para el análisis de TBARS se adquirieron los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO): Polifenol (quercetina), sulfato ferroso (FeSO_4), NaCl, NaOH, KCl, NaHPO_4 , KH_2PO_4 , ácido tricloroacético, ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) y ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

VIII.1.2. Agentes químicos y soluciones para cuantificar proteínas por el método de Lowry. Para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry, los siguientes reactivos fueron adquiridos: albúmina de suero de bovino (BSA) [A-7906], reactivo de Folin–Ciocalteu (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico), PBS (9.5 mM, pH 7.4), Na_2CO_3 2%, NaOH 0.1 N, Tartrato 2% Na/K y CuSO_4 1% (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO).

VIII.1.3. Agentes químicos y soluciones para cuantificar actividad antioxidante con DPPH. La actividad de captura por los antioxidantes de los radicales libres fue determinada con 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO).

VIII.1.4. Agentes químicos y soluciones para cuantificar compuestos fenólicos. La concentración total de los compuestos fenólicos fue con el reactivo de Folin-Ciocalteu, 0.3% HCl, carbonato de sodio (2% Na_2CO_3) y ácido gálico, que se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO).

VIII.1.5. Agentes químicos y soluciones para extendidos citológicos y tinción de los eritrocitos. La tinción celular se realizó preparando formol amortiguado neutro al 10%, solución de tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO), etanol, xileno, y resina para montar laminillas, se adquirieron de J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, U.S.A.).

VIII.1.6. Agentes químicos y soluciones para electroforesis. Para los geles de SDS-PAGE los siguientes reactivos se utilizarón: cloruro de sodio, alcohol isobutilico,

metanol y ácido acético, adquiridos de J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, NJ, U.S.A.). SDS, Tris, glicina, azul de coomassie brillante R-250, kit de tinción de plata, TEMED, persulfate de amonio, N,N-1-metil-bis-acrilamida, acrilamida y marcadores de peso molecular bajo fueron de Bio-Rad (Richmond, CA, U.S.A.).

VIII.1.7. Agentes químicos y soluciones para preparar los eritrocitos y células fantasmas. Tubos Vacutainer con EDTA, PBS pH 7.4 y 8.0.

VIII.1.8. Agentes químicos y soluciones para preparar los extractos de tejocote. *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol, se adquirieron de Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO). Todos los solventes fueron de grado analítico.

Las demás soluciones y reactivos químicos incluyendo el agua 2*d*-deionizada (18.3 MΩ, Sistema Milli Q-II. Millipore, U.S.A.), fueron de alto grado y calidad analítica, y libre de microorganismos.

VI.2. Métodos

El presente trabajo de investigación fue de tipo básico, transversal y descriptivo.

VI.2.i. Obtención de los frutos de tejocote. Cuatro kilogramos de los frutos de tejocote (*Crataegus mexicana*) fueron recolectados de la zona de San Pablo Apetatitlán, en el Estado de Tlaxcala, México, en los meses de octubre y diciembre del 2012. El método de colecta y selección fue la denominada colecta dirigida, basado en vistas previas y el conocimiento de la localidad indicada, considerando los fenotipos superiores en cuanto a tamaño de fruto, apariencia visual libre de defectos y homogeneidad en color. Se seleccionaron al menos 50 frutos (1/2 Kg) en madurez, distribuidos en los cuatro puntos cardinales del árbol, los cuales fueron llevados al laboratorio de química de alimentos de la Escuela de Nutrición de la UAT.

VI.2.ii. Obtención de la epidermis de tejocote. La fruta seleccionada se lavó cuidadosamente y la epidermis se separó manualmente de la pulpa, se congeló y se liofilizó para eliminar el exceso de agua por 6 horas en una Liofilizadora (Labconco, Ind.) a -50° C. Se obtuvieron 36.0 g de epidermis seca, posteriormente fueron molidas hasta casi polvo utilizando una malla tamaño 20. Las muestras fueron mantenidas

congeladas a -20 °C hasta su uso, solo las muestras de la epidermis fueron estudiadas (Méndez y cols., 2013).

VI.2.iii. Preparación de los extractos de tejocote. Treinta gramos de la muestra molida fue homogeneizado a temperatura ambiente y se realizó la extracción secuencial de los extractos por 72 horas, colocando la muestra molida en 300 mL de los siguientes solventes: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y finalmente en metanol. Cada una de las fracciones obtenidas de los extractos en cada solvent, fueron separadas en diferentes recipientes y evaporadas hasta su totalidad utilizando un rotovapor, hasta obtener la muestra seca y eliminar en lo posible la totalidad del solvente. Los extractos obtenidos se mantuvieron secos en frascos ámbar a 5 °C hasta su uso. Solo el extracto de acetone de tejocote (EPT) fue utilizado para el presente estudio.

VI.2.iv. Análisis de la reducción de la actividad oxidante con DPPH. El efecto de los antioxidantes en el extracto de acetona EPT para atrapar los radicales libres, fue determinado utilizando DPPH (Kim y cols., 2005). Brevemente, 100 µL del extracto de acetone EPT fue preparado a una concentración de 20 mg/L en DMSO. Luego, diluido en etanol frío para obtener concentraciones finales de 4000, 400, and 40 mg/L. El DPPH fue disuelto en etanol (1 mM). Un total de 50 µL del extracto de acetona EPT y 150 µL de DPPH (para obtener concentraciones finales de acetona EPT a 1000, 100, and 10 mg/L) fueron mezclados e incubados por 30 min a 37 °C en un agitador orbital. Se leyó la absorbanza a 517 nm utilizando un lector de microplatos de Elisa (Bio-Tek EL800, U.S.A.). El porcentaje de actividad de reducción de DPPH fué calculado y expresado como la IC₅₀ (Khattak y cols., 2008) utilizando seis concentraciones del extracto de acetona EPT (5.6 - 100 mg/L). El antioxidante puro de quercetina fue utilizado como control estándar.

VI.2.v. Determinación de compuestos fenólicos totales. El contenido total de fenoles en el extracto de acetona EPT se determinó usando el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (Folin, 1927) con modificaciones como se ha descrito previamente

(Méndez y cols., 2013). Brevemente, 3 mg del extracto de acetone EPT se agregaron a 40 mL de metanol/agua (50:50, v/v) por 1 h a 25 °C, el sobrenadante fue colectado y almacenado (extracto de metanol). A la muestra residual se le agregaron 40 mL de acetona/agua (70/30, v/v) a 25 °C por 1 h (extracto de acetone). El extracto de metanol y acetone se mezclaron, evaporarón, y se redisolvieron nuevamente en 10 mL de etanol (extracto de etanol). Finalmente, la muestra residual se disolvió en 10 mL de H₂O (extracto acuoso). Un mL de cada uno de los extractos se aforó a un volume de 2.5 mL usando 0.3% HCl. Subsecuentemente, 50 µL de la muestra o del estandar fue agregado a 1 mL de 2% Na₂CO₃, seguido de la adición de 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluído en agua (1:1). Después de 30 minutos de incubación a 25 °C, se leyó la absorbancia a 750 nm por medio de un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Electron Co. U.S.A.). El contenido total de fenoles se expreso como el equivalente en mg de ácido Gálico por gramo de acetona EPT (GAE/g) utilizando una curva estándar de una solución recién preparada de ácido Gálico (concentraciones de 0.2 - 1.0 mg/mL).

VI.2.vi. Selección de los sujetos y examen clínico. Se seleccionaron 8 sujetos del género masculino, con un rango de edad entre 20 y 30 años (DE ± 11.1), a quienes se les realizó un examen clínico y determinar los criterios de exclusión, incluyendo que no presentaran enfermedades crónico-degenerativas como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, anemia, no utilizaran drogas recreativas o estuvieran bajo tratamiento médico, tener historia previa de alcoholismo o tabaquismo, no estuvieran sometidos a ejercicios excesivos que incrementara el estrés oxidativo y no tomaran antioxidantes en cualquier formulación comercial. Todos los sujetos fueron alumnos de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT), a quienes se les informó del propósito del estudio y se les invitó a participar de manera voluntaria y con consentimiento por escrito en el estudio (**Anexo III**). El estudio se explico a todos los sujetos. El estudio fue aprobado por el comité de ética para investigación en muestras biológicas de la propia institución, Facultad de Nutrición y Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (**Anexo I y II**). También se solicitaron los permisos y autorización respectiva del proyecto ante la

Secretaría de Salud del Estado de Tlaxcala y el COFEPRIS y COEPRIS. Se siguieron los procedimientos de acuerdo al protocolo en la sección VIII.2.ii., VIII.2.iii., VIII.2.iv., VIII.2.v., VIII.2.vi., de la Secretaría de Salud (**Anexo IV y V**). También se obtuvo el IMC de cada sujeto, midiendo cuidadosamente su talla y peso ($IMC = \text{peso [kg]} / \text{altura [m}^2\text{]}$) y correlacionarlo con su estado de salud en general.

VI.2.vii. Obtención de las muestras de sangre. La colección de sangre y el manejo de las muestras fue siguiendo el protocolo para el manejo de material humano del “Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, Artículos, 11, 17, 23, 57, 109, 114, y previa autorización del Comité de Ética de la Escuela de Nutrición del área de Ciencias de la Salud de la UAT (**Anexo I y II**). De igual manera, se solicitó el permiso (en trámite) al COFEPRIS para el desarrollo del protocolo en humanos (**Anexo IV y V**). Para la presente investigación se utilizó sangre venosa obtenida por venopuntura de la vena radial interna por la parte anterior del codo, previa asepsia con alcohol etílico de 96° y una gasa estéril. Todo el material utilizado está previamente esterilizado y se desecha en depósitos de acuerdo al reglamento del manejo y desecho de material orgánico (OPS, 1983). La obtención de las muestras de sangre la llevó a cabo por la Q.F.B. Eva Enríquez Olivares, responsable del laboratorio de análisis clínico de la clínica 8 del IMSS. Se obtuvo un promedio de 6.8 mL de sangre venosa por cada sujeto. La toma de las muestras fue de 8 a 10 de la mañana, solicitando a los sujetos presentarse en ayunas por lo menos 12 hrs.

VI.2.viii. Manejo y preparación de las muestras de sangre. Cada muestra de sangre (6.8 mL) de cada individuo fue colectada por veno-puntura de la vena radial interna y colocada directamente en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente a 3000 rpm durante 10 minutos a 25 °C, para separar por centrifugación los eritrocitos del plasma sanguíneo. Ya separados los eritrocitos del plasma fueron lavados 3 veces en una solución de PBS (1:1) (0.1 M (0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, and 2.16 g NaHPO₄·7H₂O)/L), pH 7.4 (con 10% NaOH) a 3600 rpm por diez minutos en cada centrifugación, en cada lavado

las células blancas fueron retiradas con pipeta. La muestra de sangre de cada individuo se utilizó por separado para formar 2 grupos, uno con eritrocitos control (EC) y en una muestra con eritrocitos experimental (EE). Ambos grupos se sometieron a los diferentes procedimientos con el extracto de tejocote para determinar el grado de lipoperoxidación *in vitro*. Las muestras de sangre fueron almacenadas en PBS en las condiciones iniciales del hematocrito (1:1). Las muestras fueron preparadas y analizadas el mismo día de colección, a menos que se requiriera otro procedimiento.

VI.2.ix. Determinación del volumen sanguíneo y hematocrito. Obtenidas las muestras de sangre y centrifugadas, se determinó el volumen total de sangre y se obtuvieron los valores del hematocrito de cada individuo, de acuerdo al procedimiento descrito en los antecedentes, con el propósito de determinar la cantidad de eritrocitos presentes en la sangre y mantener la misma cantidad durante los procedimientos experimentales. Para obtener estos valores se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{CRS}}{\text{Volumen total de sangre}} \times 100 = \% \text{ de hematocrito ó fracción decimal}$$

VI.2.x. Determinación de hemoglobina en sangre. Obtenidas las muestras de sangre y centrifugadas, se determinó el volumen total de sangre y se obtuvieron los valores del hematocrito, de acuerdo al procedimiento descrito en los antecedentes. Con el propósito de determinar la cantidad de hemoglobina en sangre se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{VOLUMEN DE ERITROCITOS (mL)} \times 0.003 = \text{Hb g/L}$$

VI.2.xi. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry. Inmediatamente después de obtener la sangre de los pacientes, los eritrocitos se separaron del plasma por centrifugación a 3600 g por 10 minutos, y se lavaron y centrifugaron 3 veces con un volumen igual de PBS, pH de 7.2 (Anexo). Con los eritrocitos libres de plasma sanguíneo, se cuantificó el total de proteínas por el método de Lowry, estandarizando el contenido de lípidos de la membrana celular del eritrocito a

2.66 mg/L, ya que teóricamente existe una relación directa entre proteínas y lípidos en su membrana. Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (Alexander, 1984), con un lector de ELISA a una absorbancia de 540 nm.

VI.2.xii. Preparación de los eritrocitos (CRS) para formar células fantasmas (CF).

Para este procedimiento se utilizó la técnica de resellado de eritrocitos por la técnica de dilución hipotónica-hipertónica (Krishnaveni G., y cols., 2013; Jangde R., 2011; Matteucci y cols., 1995). Inmediatamente al lavado de los eritrocitos con PBS a un pH de 7.4, estos fueron incubados a una temperatura de 23 °C, por 24 horas en una solución de PBS a un pH de 8.0, lavando y centrifugando en varias ocasiones con la misma solución, lo que permitió eliminar la hemoglobina. Posteriormente se volvieron a colocar los eritrocitos en solución de PBS pH 7.4 a la mitad del volumen original del hematocrito, lo que permite cerrar la membrana del eritrocito y formar las células fantasmas, lo cual se monitoreó microscópicamente para evitar lisis de las células (Figura 23).

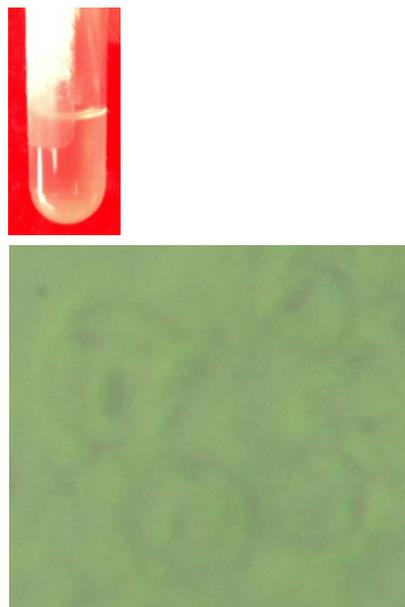


Fig. 23. Aspecto macroscópico y microscópico de las células fantasmas.

VI.2.xiii. Determinación de la lipoperoxidación en eritrocitos y células fantasmas sometidas al pro-oxidante FeSO₄, para determinar la efectividad del antioxidante con la técnica de TBARS. La actividad antioxidante del extracto de acetona EPT se estimó usando el método de Ohkawa y cols. (1979). El extracto de acetone EPT se preparó en concentraciones de 10, 30, 50, 100, and 1000 mg/L para inhibir la peroxidación lipídica inducida por el Fe²⁺ en las CRS y CF. Las CRS y CF fueron lavadas y homogeneizadas en tubos separados en 10 mL de PBS (pH 7.4) a 5

°C (1:10 p/v) (Domínguez y cols., 2005). El homogeneizado fue centrifugado por 10 minutos a 3000 g, el sobrenadante fue ajustado a una concentración de 2.6 mg de proteína/mL en PBS, para ser utilizado para la cuantificación total de proteínas de acuerdo al método de Lowry y cols. (1951). Se utilizó BSA para elaborar la curva estándar. Luego, 375 µL (1 mg de proteína) de CRS o CF fueron incubados previamente en un agitador orbital con 50 µL de EDTA 10 µM, y 50 µL de cada una de las diferentes concentraciones del extracto de acetona ECT a 37 °C por 30 min., y obtener una concentración del extracto diluido de 3-50 mg/L. La peroxidación lipídica se inició al adicionar 50 µL of FeSO₄ (concentración final = 25 µM) (Ng y cols., 2000). Pasada una hora las muestras fueron enfriadas sobre hielo, y se agregó 0.5 mL de TBA (1% 2-ácido tiobarbiturico en 0.05 N NaOH y 30% ácido tricloroacético, 1:1). Las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 3000 g. La peroxidación lipídica y sus productos finales en CRS y CF fue determinada por la presencia de malondialdehído (MDA) con el método de TBARS (Kibanova y cols, 2009). Las muestras fueron calentadas a 94 °C por 30 minutos en una tina de agua hirviendo. Después se enfrió en hielo y 200 µL de cada muestra y una muestra blanco, se colocaron en un pozo de un microplato para ser leídos a una absorbancia de 540 nm. Los resultados de TBARS se expresaron como el equivalente de MDA, comparándolo con el estándar 1,1,3,3-tetrametoxipropano. El porcentaje de inhibición se define como el decremento de la formación de TBARS, debido a la quelación del extracto (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La inhibición de la peroxidación lipídica hasta 50% (IC₅₀ µg/mL) en cada extracto fue comparado contra el logaritmo de concentración en cada muestra de *Crataegus mexicana* y el porcentaje de peroxidación lipídica inducida por el FeSO₄ 25 µM (100%).

VI.2.xiv. Peroxidación lipídica inducida con FeSO₄ en las CRS para realizar el análisis morfológico. El extracto de acetona ECT se diluyó a 5, 10, 100, y 1000 mg/L en PBS con el pro-oxidante FeSO₄ (100 µM). Luego, 25 µL CRC (~ 125 x 10⁶ células) se agregaron a cada dilución y se incubaron a 25 °C durante 5, 30, 120, 180 minutos, 1, 2, 15, 22, 24, y 28 días. Se prepararon muestras control sin el FeSO₄ o el extracto de acetona ECT. Los experimentos se llevaron a cabo con cada tipo de célula por triplicado.

VI.2.xv. Análisis citológico. Las muestras de CRS (2 μL = $\sim 10 \times 10^6$ células) se tomaron de los diferentes tiempos de incubación, extendidos en un portaobjeto de vidrio limpio e inmediatamente fijados con formaldehído amortiguado al 10%. Las células fueron teñidas con HE y un cubreobjeto de vidrio fue colocado para su observación al microscopio con objetivo de aumento de 40x, y 100x usando un objetivo con aceite de inmersión. Se utilizó un microscopio Olympus CH30RF100 (Olympus Optical Co. LTD, Japan) con una cámara digital conectada a una PC y un Sistema de análisis de imagen (Motic Images Plus 2.0, Motic China Group Co. LTD) para cuantificar los cambios morfológicos estáticos y cinéticos de la CRS. El análisis histométrico fue un estudio doble ciego, en el que el único observador no conocía el tipo de muestra o a que grupo pertenecía el extendido citológico que observaba

VI.2.xvi. Determinación de la morfología del eritrocito. De cada muestra de sangre (EE y EC) se tomaron 5 μL de eritrocitos (0.2% del hematocrito = ± 25 millones de células) que fueron colocados en 10 μL de PBS sobre un portaobjetos de vidrio limpio, extendiendo la muestra y realizar una citología de cada fase del procedimiento y comparar los cambios entre ambos grupos EE y EC. Las CRS se cuantificaron en tres áreas estandarizadas de cada laminilla (0.1 mm x 0.1 mm de cada lado). En cada área tres diferentes campos de 70 μm cuadrados se seleccionaron para contar los eritrocitos. Cambios en la intensidad de color por la tinción (Anisocromía), tamaño (Anisocitosis), forma (Poiquilocitosis), inclusiones y otros cambios morfológicos en la CRS fueron determinados de acuerdo a la descripción de Mackenzie (2000) y Brecher (1972) como sigue:

Tinción: Normocrómico

Hipocrómico

Hiperocrómico

Tamaño: Normocítico (7 – 8 μm)

Microcítico (menor de 7 μm)

Macrocítico (mayor de 8 μm)

Forma: Acantocito (crenada)

Equinocito

Inclusiones: Cuerpos de Heinz

Otros: Hemólisis

Esquistocitos

- a. Inicialmente, las células lavadas en PBS fueron observadas a temperatura ambiente (~ 23 °C), directamente sin teñir sobre un portaobjeto, al cual se le trazó un canal de flujo con lápiz de diamante (modificado de Wandersee y cols, 2005), utilizando un filtro verde, bajo el microscopio de luz (Zeiss Primo Star) con un objetivo de 40X y con objetivo de inmersión de 100X. Las imágenes estáticas y cinéticas fueron capturadas con filtro azul y verde utilizando una cámara Kodak con formato SCN < 30 cm. Se realizaron observaciones al minuto 0, 5, 30, 1h, 2h, 3h, 24h, 48h, 14 y 28 días. Las células fueron contadas por visualización directa (Hillery y cols, 1996), utilizando un analizador de imagen (Motif analysis systems, E.U.A.).

- b. Paralelamente al procedimiento anterior, otro grupo de células EE y EC fueron fijadas con formol buffer al 10% para evitar la hemólisis o distorsión de los eritrocitos, Posteriormente fueron teñidas, al mismo tiempo, con la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (HE) (Estrada-Flores y cols., 1982). Ya montadas las laminillas. Se seleccionarán tres campos por extendido a 40X (70 x 70 µm) y de cada uno de estos campos se seleccionaron 3 campos a 100X (70 x 70 µm), para un total de nueve campos por extendido citológico. De cada campo seleccionado en una gradilla milimetrada, se contaron las células dentro de cada campo, excluyendo las células que tocaran la línea imaginaria limítrofe. Las células fueron observadas bajo el microscopio de luz (Zeiss Primo Star) con un objetivo de 40X y con objetivo de inmersión de 100X. Se realizaron observaciones al minuto 5, 30, 1 h, 2 h, 3 h, 24 h, 48h y a los 15, 22, 24, y 28 días. Las células fueron contadas por visualización directa (Hillery y cols, 1996), utilizando un analizador de imagen (Motif analysis systems, E.U.A.).

Se compararon los cambios en la morfología de los EC y EE de acuerdo a la tabla 3 presentada en los antecedentes, determinandose el efecto del extracto de

tejocote a diferentes concentraciones en la morfología, adhesión y tonicidad del eritrocito. Se tomaron microfotografías a 40X de 3 campos al azar y se contaron las células con cambios morfológicos.

VI.2.xvii. Dinámica de flujo de las CRS. La dinámica de flujo de las CRS se determinó usando un canal de flujo (20 μm ancho, 10 μm alto, 5 mm longitud) trazado y cortado en un portaobjeto de vidrio elaborado en el laboratorio y cubierto con un cubreobjeto de vidrio, lo que permitió la visualización directa de las células durante el tiempo de estudio (Hillery y cols., 1996). Los experimentos se realizaron a 25 °C. El portaobjetos limpio se colocó con una inclinación de 5° sobre la platina del microscopio para permitir el flujo libre y continuo de las CRS y evitar el estrés por fricción. Dos microlitros de los eritrocitos incubados por dos horas en PBS o en el extracto de acetona EPT fueron colocados en uno de los extremos del canal, permitiendo el flujo libre por 120 minutos. El número de células adherentes, crenadas (acantocitos y equinocitos), y deformabilidad durante el tiempo de flujo, fueron contadas por visualización directa con el microscopio y filmadas con un sistema de video imagen (20 imágenes por segundo), permitiendo imágenes multidireccionales de los eritrocitos. Para evitar el fenómeno de deformación o formación de equinocitos de las CRS (Brecher y cols., 1972; Bronkhorst y cols., 1995), solo se contaron y analizaron morfológicamente las células que flotaban en la parte media del canal de flujo.

VI.2.xviii. Análisis del eritrocito por electroforésis en geles de SDS-PAGE. La concentración y estandarización de las proteínas en las CRS fue por el método de Lowry.

a. Preparación de muestras y geles.- Posterior a la obtención, aislamiento de los eritrocitos y preparación de células fantasmas, 25 μL de las células ($1 \mu\text{L} = 5 \times 10^6 / \mu\text{L}$) se colocaron en 20 μL de solución solubilizante en condiciones normales y no denaturantes (0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, pH 6.8, 0.002% azul de bromofenol) y sonicados en baño maría a 100 °C por 3 minutos previamente a correr los geles. La electroforésis fue en geles de SDS-PAGE a temperatura ambiente en un sistema de gel discontinuo, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970),

utilizando un gel superior al 3% y un gel separador al 10%. La electroforésis se corrió a 100 V con corriente constante hasta que el frente azul del gel alcanzara la porción inferior de la cámara. Un aparato para minigeles (Mighty Small II vertical slab unit; Hoefer Scientific Ins., San Francisco CA., U.S.A.) fue utilizado para este propósito.

b. Tinción de los geles. Los geles fueron fijados y teñidos sucesivamente con 0.1% de azul de coomassie R250 en metanol-agua-ácido acético (1:8:1) y tinción de plata. Para obtener un buen patrón de tinción azul y violeta de las bandas, los geles se tiñeron inicialmente con la solución de azul de coomassie por una hora y desteñidos gradualmente con varios cambios de solución desteñidora (metanol-agua-ácido acético 1:8:1), durante 60 minutos hasta que se observaran las bandas teñidas, debido a las diferencias en la glicosilación de las proteínas que dan diferentes patrones de intensidad con la misma cantidad de proteínas celulares, los geles fueron teñidos con tinción de plata dando un patrón amarillo-negro.

c. Identificación de proteínas de la membrana del eritrocito (células fantasmas).- Se realizaron 8 corridas de geles de SDS-PAGE al para determinar el efecto del antioxidante en los EE y los EC. Las proteínas de membrana y del citoesqueleto fueron mapeadas e identificadas de acuerdo a su relativa movilidad en el gel y patrón de tinción, de acuerdo a los criterios descritos por otros investigadores (Singh y Rajini, 2008; Mackenzie, 2000; Ballas, 1977). Las moléculas fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño e intensidad de tinción como: Ausente (-), presente (+-) y de alta intensidad y tamaño (+). Sin embargo, debido a la subjetividad inherente de estos parámetros, las moléculas fueron también clasificadas como presentes y ausentes. Se tomaron fotografías con cámara digital y se comparó la presencia y número de bandas en los geles.

VI.2.xix. Análisis estadístico de los resultados

La edad, hemoglobina, hematocrito, volumen total de sangre, volumen globular y concentración de proteínas obtenidos de los sujetos que participaron voluntariamente, se presentaron como media \pm error estandar (EE).

La cantidad de MDA fue utilizada para calcular el % de inhibición de

lipoperoxidación en eritrocitos y células fantasmas y fue expresado en promedio \pm EE. Con una ANOVA de una vía se comparó la capacidad de inhibición del extracto de acetona EPT a diferentes concentraciones en relación a la cantidad de MDA inhibido por la quercetina en CRS y GCs.

El conteo del total de CRS se presentó como la media \pm EE. Para identificar diferencias significativas se utilizó una ANOVA de dos vías de medidas repetidas considerando como primer factor el uso de extracto de tejocote y como segundo factor el tiempo de incubación; finalmente se utilizó una Posthoc de Bonferroni, para determinar diferencias entre grupos.

La concentración total de proteínas en las membranas de los eritrocitos (células fantasmas) fueron calculados a partir de un análisis de regresión lineal obtenido de un estándar de BSA a diferentes densidades ópticas ($\text{Conc} = a * \text{Abs} + b$).

Un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado ($n = 3$). El programa GraphPad Prism (v.5.01, para Windows) se utilizó para este propósito. El programa para computadora SigmaPlot 11.0 fue utilizado para los análisis estadísticos y graphPad Prisma para graficar los resultados obtenidos.

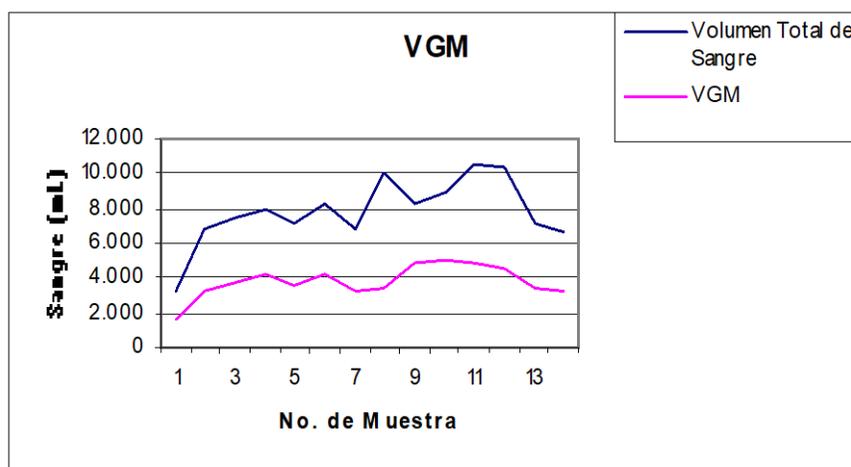
VII. RESULTADOS

VII.1. Obtención de extractos de tejocote. Se recolectaron 6.255 Kg de frutos de tejocote (*Crataegus mexicana*), seleccionándose 50 frutos (500 g). Se obtuvo un total de 38.8 g de epidermis liofilizada. De la epidermis liofilizada y seca se utilizó únicamente 30 g de muestra biológica en 300 mL de los disolventes (acetato de etilo, acetona y etanol, en este orden), obteniendo un total de 2.222 g de extracto de acetona, para ser usado en los diferentes experimentos. De esta manera, por cada kilogramo de fruta se obtienen 67.62 g de epidermis seca y a su vez 4.44 g del extracto de acetona (acetona EPT).

VII.2. Cuantificación de compuestos fenólicos totales, captura de radicales libres por DPPH y determinación del IC₅₀. El total de contenido de polifenoles en 2.222 g de epidermis seca fue de 0.68 ± 0.001 mg del equivalente de ácido gálico/g. La cantidad de DPPH reducido fue cuantificado midiendo el decremento en absorbancia de DPPH por acción del extracto de acetona EPT. El IC₅₀ del extracto de acetona EPT, para reducir radicales libres fue de 15.26 ± 0.20 mg/L comparándolo con el IC₅₀ del antioxidante puro quercetina 5.37 ± 0.14 mg/L. Se observó que el extracto de acetona es tres veces menos activo que la quercetina para reducir el DPPH.

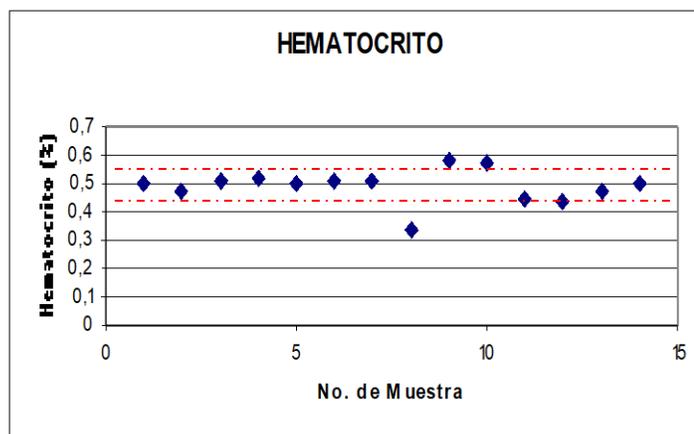
VII.3. Sujetos de estudio y resultados del análisis de las muestras de sangre. Se colectó sangre de 8 donadores voluntarios del sexo masculino con un promedio de edad de 32 años, peso promedio de 59.9 Kg y el IMC de 21.4 ± 5.2 kg/m², todos clínicamente sanos al momento de tomar las muestras de sangre, determinado por un interrogatorio clínico de sus antecedentes patológicos y no patológicos. Cuatro de los sujetos tenían sangre O⁻, dos O⁺, dos con AB⁺ y uno con A⁺. Se obtuvieron 14 muestras de sangre de acuerdo a lo señalado en el protocolo.

VII.3.a. Promedio de sangre total y volumen globular medio. Se obtuvo de cada sujeto un promedio de 7.8 mL (rango de 3.2 a 10.6 mL) (**Gráfica 1**).



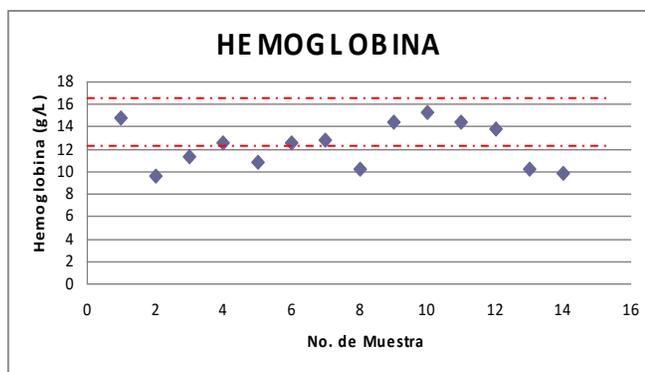
Gráfica 1. Volumen total y VGM de las catorce muestras obtenidas

VII.3.b. Determinación del Hematocrito. El promedio de volumen de eritrocitos para cada muestra fue de 3.8 mL. (rango de 1.6 a 5.6). Calculando el valor del hematocrito se obtuvo una media de 0.49 ± 0.05 (rango de 0.44 a 0.58) lo que se considera dentro de los parámetros normales para un hematocrito en hombres (rango normal 0,40 - 0,50) (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Porcentaje del hematocrito en las muestras estudiadas. Las líneas rojas señalan los rangos promedios (0,45 – 0,55).

VII.3.c. Determinación de la Hemoglobina. El promedio de hemoglobina de acuerdo al VGM de los eritrocitos en cada muestra fue de Hb de 12.5 ± 1.8 mg/dL (rango de 9.6 a 15.3), ligeramente por debajo del rango normal debido a que dos sujetos presentaron valores por debajo de 11.0 mg/dL (**Gráfica 3**).



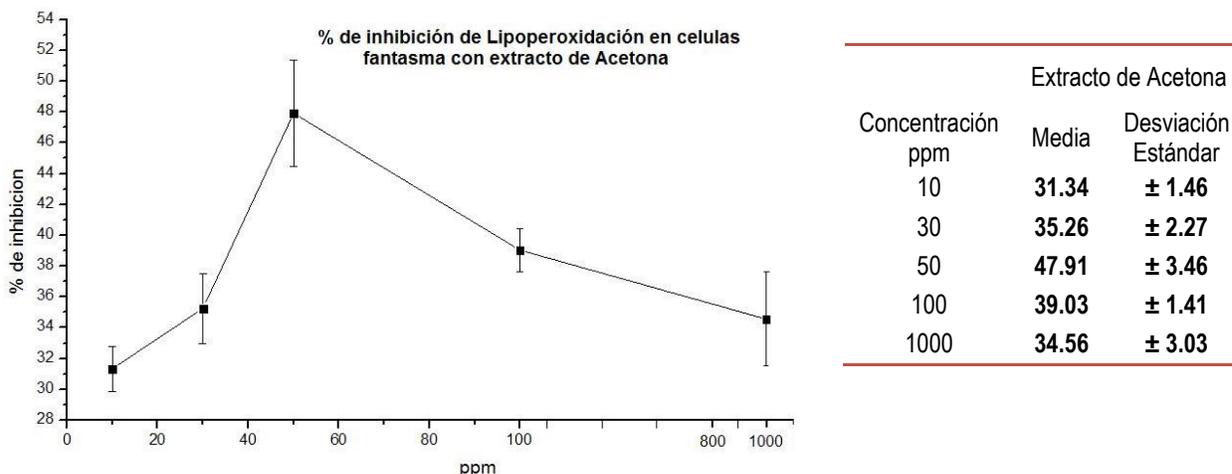
Gráfica 3. Valores de la hemoglobina total en las muestras estudiadas. Las líneas rojas señalan los rangos promedios (12.5 – 16.5).

VII.3.d. Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry. En cada sujeto, se cuantificaron por duplicado las proteínas totales posterior al lavado con PBS, obteniendo un valor promedio de 15.058 mg/mL de proteínas totales.

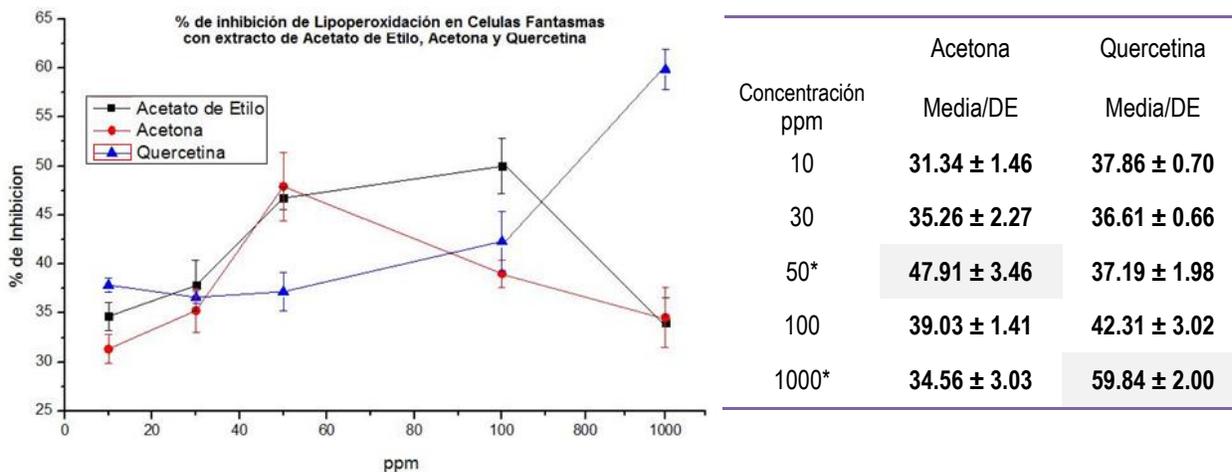
VII.4. Determinación de la lipoperoxidación por presencia de MDA en eritrocitos y células fantasmas y efectividad del extracto de acetona EPT como antioxidante con la técnica de TBARS. Las células rojas de la sangre tienen lípidos saturados y no saturados, así como ácidos grasos en su membrana celular, los cuales son susceptibles a ser peroxidados por las ERO. Para determinar la capacidad del extracto de acetona EPT se utilizó el ión ferroso (Fe^{2+}) que es capaz de formar peróxidos lipídicos que inducen la formación de sustancias altamente reactivas como los radicales hidroxilo y las especies reactivas perferil y ferril. Para evaluar la efectividad del extracto de proteger a los eritrocitos y a las células fantasmas de ser lipoperoxidadas, se utilizaron diferentes concentraciones del extracto, como se describió previamente en material y métodos. Se realizaron 16 corridas experimentales por triplicado de las muestras de sangre. En todos los casos la reacción al ácido tiobarbitúrico fue positiva.

El promedio general del porcentaje de inhibición del extracto de acetona de tejocote *Crataegus mexicana* fue de 37.23%, presentando su mayor porcentaje de inhibición a 50 ppm con un porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación de células fantasma de eritrocitos humanos de 47.91%, y en los eritrocitos fue de 46.84%. Sin

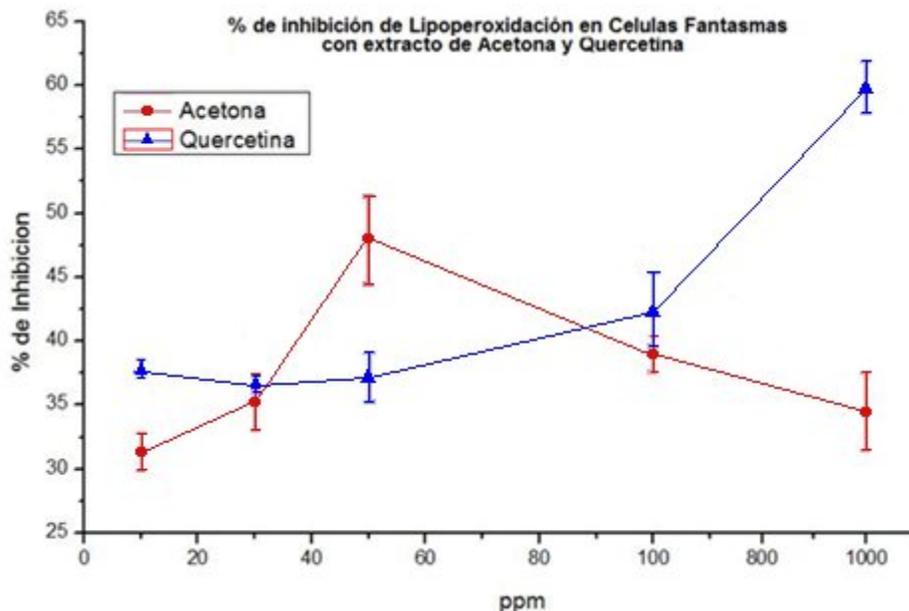
embargo, el promedio general fue menor en comparación con los porcentajes de inhibición de los antioxidantes sintéticos que se utilizaron como controles, quercetina de 45.48% y β -caroteno de 42.61% (dato no graficados). Los resultados se muestran en la **gráfica 4A, 4B y 4C**.



Gráfica 4A. Porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación del extracto de acetona de tejocote *Crataegus mexicana* en células fantasmas. Los datos representan la media \pm DE de 9 experimentos por triplicado con TBARS a diferentes concentraciones (10 a 1000 ppm).



Gráfica 4B. Comparación de los porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación entre el extracto de acetona de tejocote *Crataegus mexicana*, extracto de acetato de etilo y el control Quercetina en células fantasmas. Los datos representan la media \pm DE de 9 experimentos por triplicado con TBARS a diferentes concentraciones (10 a 1000 ppm). *p = 0.005



Gráfica 4C. Comparación de los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación entre el extracto de acetona de tejocote *Crataegus mexicana* y el control Quercetina en células fantasmas. Los datos representan la media \pm DE de 9 experimentos por triplicado con TBARS a diferentes concentraciones (10 a 1000 ppm). *p = 0.005

VII.5. Cuantificación y cambios morfológicos de las CRS y CF. Previo a los experimentos con las CRS y las CF que fueron incubados con el extracto de acetona EPT se realizaron una serie de experimentos para estandarizar y determinar que durante el tiempo que duraran los procedimientos experimentales, los eritrocitos no sufrieran cambios por envejecimiento o por eriptosis que pudieran alterar o influir en los resultados.

VII.5.a. Cuantificación y cambios morfológicos de los eritrocitos con y sin extracto de acetona EPT. Las CRS fueron incubadas en el extracto de acetona EPT de *Crataegus mexicana* con el prooxidante FeSO_4 a diferentes concentraciones y analizadas para determinar cambios morfológicos, en la eriptosis y la hemólisis de los eritrocitos. El grado de hemólisis de las CRS con diferentes concentraciones del extracto de acetona EPT mostró una correlación entre el tiempo y el daño a los eritrocitos durante los 28 días de incubación. Los eritrocitos incubados con altas concentraciones del extracto de acetona EPT sufrieron menos daños comparándolos con aquellos que fueron incubados con menores concentraciones del extracto de

acetona EPT, observándose directamente en los tubos la presencia de menor acumulación de hemoglobina en la solución de PBS donde se depositaron los eritrocitos (datos cualitativos).

Se observaron los siguientes cambios en los eritrocitos comparando entre el (A) grupo control al que no se le aplicó extracto de tejocote y fueron colocados en PBS con y sin FeSO_4 y (B) el grupo experimental al cual se le aplicó el extracto de tejocote (concentración 1:100 v/v) con FeSO_4 . En ambos casos se hicieron observaciones al microscopio con células fijadas y teñidas con HE para determinar la morfología celular. El grupo control que corresponde a los eritrocitos colocados en PBS y PBS/ FeSO_4 presentó en los extendidos citológicos cambios morfológicos y cinéticos muy marcados, observándose a los 5 minutos eritrocitos microcíticos, hipocrómicos, globocitos, congregación y coagulación, así como hemólisis celular a los 30 min. (**Figura 24**).

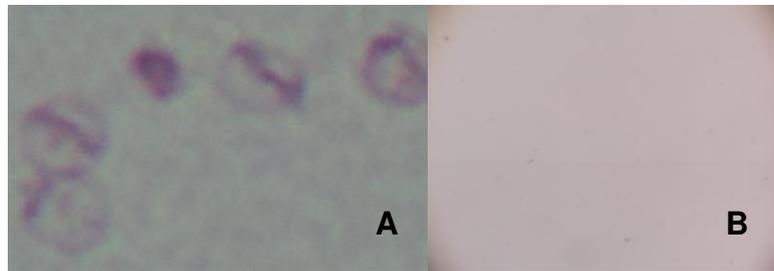


Fig. 24.- Imagen microscópica a los 5 min. (A), y a los 30 minutos (B), de eritrocitos sin extracto de tejocote y sulfato ferroso.

El grupo experimental sometido al extracto de tejocote con sulfato ferroso presentó pocos cambios a los 5 minutos, observándose únicamente escasos microcitos, a los 30 minutos ya se observan estomatocitos y espinocitos, y a los 28 días los eritrocitos conservan sus membranas existiendo cambios morfológicos (**Figura 25**).

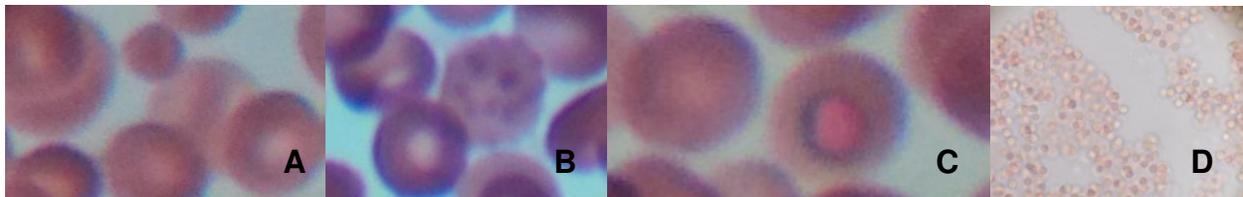


Fig. 25.- Imagen microscópica a los 5 min. (A - microcito, B - espinocito, C - estomatocito), y a los 28 días (D - conservan su membrana) de eritrocitos con extracto de tejocote y sulfato ferroso.

Estos resultados sugieren un menor nivel de hemólisis y daño en la membrana de los eritrocitos, ya que mantienen su color y existe menor velocidad en la formación del coágulo o coagregación de los eritrocitos, indicando menores cambios reológicos en la superficie de las células rojas de la sangre (**Fig. 26**). Estas observaciones sugieren un efecto antioxidante del extracto de acetone EPT en las CRS; los cambios son similares a las descritas por Baek y cols. (2012), quienes describieron un menor daño a las células utilizando haptoglobina como antioxidante en los eritrocitos de cuyos de guínea.

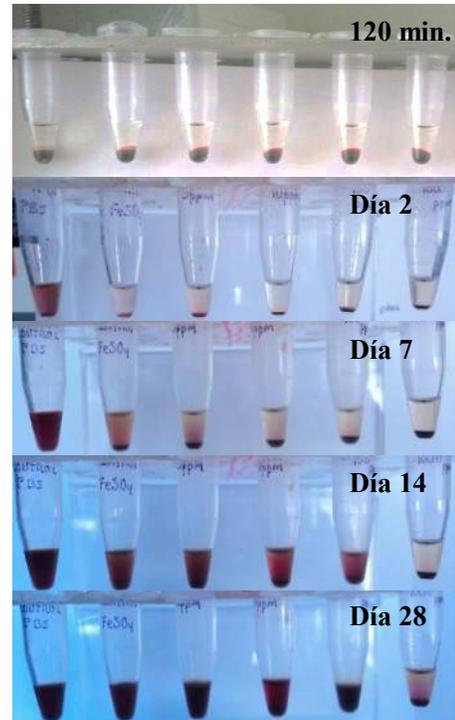


Fig. 26. Efecto del incremento de las concentraciones del extracto de acetone EPT de *Crataegus mexicana* en la lesión producida a las CRS a diferentes tiempos de incubación (izquierda a derecha): CRS/PBS, CRS/PBS/FeSO₄, CRS/PBS/FeSO₄/ con 5, 10, 100, y 1000 mg/L acetone EPT respectivamente. Las muestras muestran menor liberación de hemoglobina en el medio de incubación, conforme pasa el tiempo y se incrementa la concentración del extracto de acetona EPT.

El proceso de hemólisis es más rápido en CRS que no fueron incubadas con el extracto de acetona EPT (**Fig. 27A - F**) y comienza al día 7 de incubación, comparándolo con las CRS incubadas con el extracto de EPT (**Fig. 27G - L**) en donde el proceso de hemólisis comienza posteriormente. Todos los cambios morfológicos fueron descritos independientemente al igual que la suma de estos cambios.

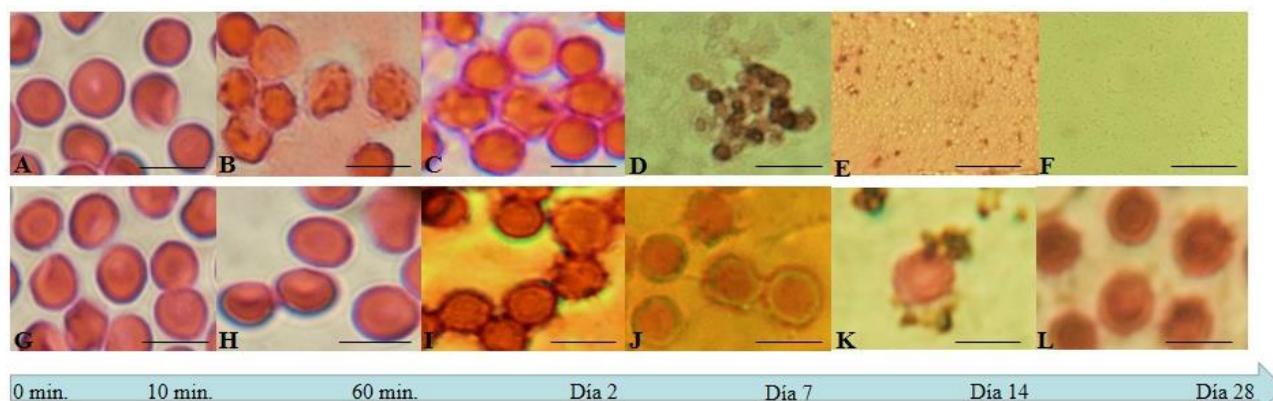


Fig. 27. Efectos del extracto de acetone EPT en el contorno y la morfología de los eritrocitos. CRS incubadas solo en PBS (superior) y CRS incubadas en 100 mg/L del extracto de acetona EPT (inferior) a diferentes tiempos, ambas con FeSO_4 100 μM . La morfología celular fue examinada con microscopio de luz. Fotos A-F CRS incubadas en PBS/ FeSO_4 ; Fotos G-L CRS incubadas en PBS/ FeSO_4 /100 mg/L del extracto de. HE 100x, utilizando diferentes filtros del microscopio, Bar = 10 μm .

(1) **Eritrocitos Normocíticos y Normocrómicos.** El conteo de las CRS fue similar en ambos casos, observando al inicio del experimento células normocíticas que fueron o no incubadas con el extracto de acetona EPT. El conteo de células fue más fácil en los eritrocitos tratados con el extracto EPT, en comparación con aquellas no tratadas con el extracto, ya que el extendido citológico en las células no tratadas presentó grandes cantidades de agregados celulares que hicieron difíciles separarlas unas de otras. El extendido citológico de las CRS tratadas con el extracto de acetona EPT fue más homogéneo y las células presentaron mejor separación entre ellas, esto podría deberse a la actividad antioxidante del extracto desde el momento que las células se incubaron y entraron en contacto con el EPT. Las CRS con el extracto de acetona EPT se mantuvieron por mayor tiempo hidratadas, lo que sugiere que no hubo pérdida de agua dentro de la célula, manteniendo su membrana intacta por mayor período de tiempo. Cambios morfológicos y hemólisis de las CRS fueron evidentes a los 180 minutos, tanto en los eritrocitos control como los incubados con el extracto de acetona EPT; la hemólisis de los eritrocitos no tratados con el extracto inicia a las 48 horas (**Fig. 28a**). En las CRS tratadas con el extracto de acetona EPT, la hemólisis de las células empieza posteriormente, mateniendo algunas células su morfología hasta por 28 días (**Fig. 27K-L**). La cuantificación total de las CRS mostró el efecto del extracto de acetona EPT ($P=0.0078$), durante el tiempo de incubación en minutos y días ($P=0.001$). De manera similar, una relación entre la concentración del extracto y la

respuesta de los eritrocitos fue observada en los diferentes tiempos de incubación.

(2) **CRS Anisocíticas.** Un incremento en el número de eritrocitos microcíticos se observó durante los primeros 120 minutos, tanto en las células incubadas en PBS/FeSO₄ como en las células incubadas en PBS/FeSO₄/acetona EPT. Posterior a la formación de microcitos, se observó un decremento de estas células hasta que fueron completamente lisadas. Sin embargo, las células tratadas con el extracto de acetona EPT se mantuvieron presentes hasta por 28 días. Esto sugiere que la formación de células crenadas y el proceso de eriptosis se retarda con el extracto de acetona EPT (**Fig. 28b**). No se observó ningún efecto en la formación de células microcíticas por el extracto de acetona EPT ($P=0.21$), sin embargo el tiempo de incubación ($P=0.0001$) y la interacción del extracto con las células ($P=0.0026$) induce la formación de microcitos.

(3) **Crenadas, acantocitos.** La oxidación de las principales proteínas estructurales del eritrocito, la espectrina y la actina, que forman la red del citoesqueleto de la submembrana de las CRS, induce cambios morfológicos y viscoelásticos en la membrana celular, observándose con la formación de burbujas (blebs) en la superficie de la células (**Fig. 27B – C, y 28c**). Las CRS con el extracto de acetona EPT mostraron una inhibición temprana en la continua formación de estas burbujas durante el fenómeno oxidativo, por lo tanto también se inhibió el proceso de eriptosis y la hemólisis durante la vida media del eritrocito (**Fig. 27I – L, y 28c**), comparándolas con las CRS del grupo control. Estos datos sugieren que el extracto está actuando y reduciendo la deformación del citoesqueleto de la membrana causada por el efecto oxidativo del FeSO₄, durante el proceso de de la lipoperoxidación de los fosfolípidos en la bicapa lipídica, probablemente inhibiendo la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de amino ácidos, la formación de uniones entrecruzadas de proteínas-proteínas y la oxidación de la columna principal de proteínas del citoesqueleto en el eritrocito. Los cambios morfológicos durante las primeras 24 horas, alcanzaron su pico máximo a los 120 minutos en los eritrocitos no tratados con el extracto. Una menor formación de células crenadas está relacionada con el factor extracto de acetona EPT ($P=0.0067$), tiempo ($P=0.0001$) y factores de interacción ($P=0.0001$). Estos cambios

morfológicos se han descrito como Tipo I y II Brecher y Bessis (1972) durante el proceso de eriptosis de las CRS. Como ya se mencionó, las CRS tratadas con el extracto de acetona EPT no incrementa estos cambios dependientes del tiempo.

(4) **Crenadas, equinocitos.** Conforme el tiempo pasa, los cambios morfológicos en las CRS son más evidentes. El proceso oxidativo y la crenación en las CRS genera la formación de prolongaciones espiculadas en la membrana, debido a la deformación de la membrana por la oxidación de lípidos y proteínas del citoesqueleto. Estos cambios se vuelven irreversibles y son determinantes en el proceso de eriptosis de la CRS (**Fig. 27C, y 28d**). El extracto de acetona de *Crataegus mexicana* inhibió la formación de equinocitos, posterior a la formación de acantocitos, retardando la deformación de las células y el proceso de hemólisis (**Fig. 27I – K, y 28d**). Una acción dependiente del tiempo en la formación de equinocitos ($P=0.0001$) y su interacción con el extracto de acetona EPT fue observada ($P=0.0067$). Estos cambios morfológicos en la membrana celular del eritrocito se han denominado como Tipo III (Brecher y Bessis, 1972), con diferentes fases en la deformación de la membrana, ésta es considerada como una alteración morfológica irreversible durante la vida media del eritrocito y por lo tanto en el proceso de eriptosis. El proceso biológico en la formación de acantocitos mediada por la formación de radicales libres en las proteínas de la membrana es similar en los equinocitos cuando son oxidados por el FeSO_4 .

(4) **Cuerpos de Heinz.** La oxidación de la hemoglobina produce en su estructura primaria el entrecruzamiento de las uniones disulfuro adyacentes a la cadena de globina, la cual se distorciona y eventualmente permite la formación de precipitados visibles en la porción interna de la membrana celular de las CRS. El extracto de acetona EPT fue capaz de inhibir la formación de estos cuerpos desde el principio de los experimentos *in vitro* hasta por 24 días. Las CRS sin el extracto de acetona iniciaron la formación de los cuerpos de Heinz al minuto 30, incrementando su formación en los siguientes minutos y días. El incremento de los precipitados de hemoglobina se asoció a la distorsión de los eritrocitos en la fase final de la formación de los acantocitos, durante el proceso de eriptosis.

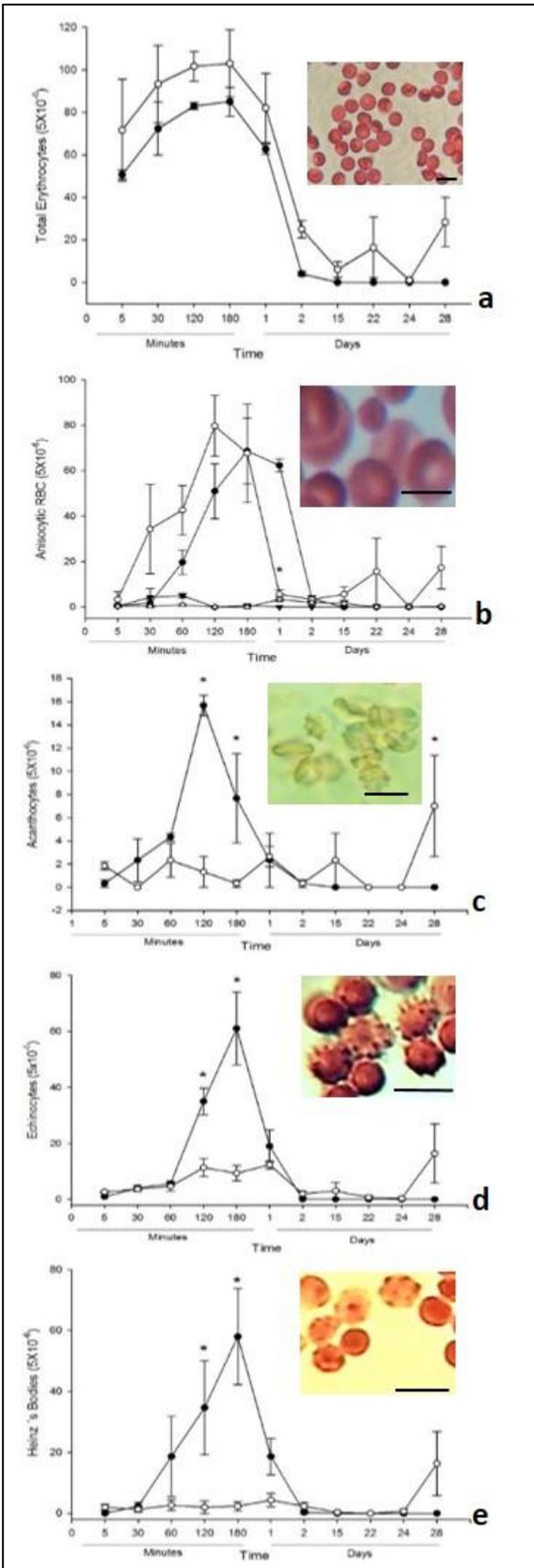


Fig. 28 (a) Comparación cuantitativa entre CRS totales en PBS/FeSO₄ (•), y CRS en PBS/FeSO₄/acetona EPT (○) y el tiempo. Inserto: Microscopía de luz de CRS normocíticas y normocrómicas a los 5 minutos. HE 40x, bar = 10 μm.

(b) Interacción entre CRS microcíticas en PBS/FeSO₄ (•) y CRS microcíticas en PBS/FeSO₄/acetona EPT (○) y el tiempo. También CRS macrocíticas en PBS/FeSO₄ (▼) y CRS macrocíticas en PBS/FeSO₄/acetona EPT (△). Inserto: Microscopía de luz de un microcito observado a 180 minutos. HE 100x, bar = 10 μm.

(c) Interacción entre las CRS en PBS/FeSO₄ (•) y CRS en PBS/FeSO₄/acetona EPT (○) y el tiempo. Comparando la presencia y ausencia de acantocitos. Inserto: Microscopía de luz de acantocitos. Se observa la formación de burbujas (Bebbling) a 120 minutos. *In vitro* 100x, bar = 10 μm.

(d) Interacción entre CRS en PBS/FeSO₄ (•) y CRS en PBS/FeSO₄/Acetona EPT (○) y tiempo. Comparando la presencia y ausencia de equinocitos. Inserto: Microscopía de luz de equinocitos. Formación de estructuras en forma de espinas son observadas en la superficie de la membrana celular a los 180 minutos. HE 100x, bar = 10 μm.

(e) Interacción entre las CRS en PBS/FeSO₄ (○) y CRS en PBS/FeSO₄/Acetona EPT (•) y el tiempo. Comparando la presencia y la ausencia de cuerpos de Heinz a diferentes tiempos. Inserto: Microscopía de luz de CRS donde cuerpos de Heinz se observan en las células a 180 minutos. HE 40x, bar = 10 μm.

Medias ± EEM de tres diferentes experimentos, cada uno por triplicado. Diferencias estadísticas con el análisis de corrección de Bonferroni *

Estos datos sugieren que el extracto de acetona EPT inhibió el proceso de oxidación de la hemoglobina por un periodo mayor de tiempo ($P=0.0001$), lo que permite un mayor tiempo de vida del eritrocito ($P=0.0001$). Posteriormente, el proceso de hemólisis continuó y comenzó la formación de los esquistocitos. Estos cambios duran más en el grupo control en el cual la formación de los cuerpos de Heinz y la hemólisis tomó menos tiempo (**Fig. 27B, 27I, y 28e**).

(6) **Esquistocitos**. La formación de esquistocitos se observó en el primer día de incubación, esto es debido a la deformación, formación de burbujas (bebbling) y separación de liposomas de la superficie de la membrana celular hasta ser completamente degradada (**Fig. 27D - E**). Sin embargo, los esquistocitos se observaron en las CRS incubadas en el extracto de acetone EPT hasta por 28 días, debido posiblemente a que las células mantienen por más tiempo su membrana celular, lo que se deduce observando los resultados y gráficas en los diferentes experimentos (**Fig. 27K**).

VII.6. Dinámica de flujo, cambios cinéticos y morfológicos de las CRS.

Para evaluar la potencial contribución del extracto de acetona EPT para inhibir cualquier cambio morfológico por la oxidación de lípidos y proteínas en la membrana celular, el promedio de flujo de las CRS, adhesión y cambios morfológicos fueron cuantificados individualmente por medio de video-imagen en nueve eritrocitos en el canal de flujo sobre un periodo de 180 minutos. Las CRS incubadas en el extracto de acetona EPT presentaron mayor tiempo de flujo, a través del canal de flujo, hasta por 180 minutos, comparándolas con las células incubadas solo en PBS/FeSO₄, cuyas células se deshidrataron en menos de 6 minutos. Los cambios morfológicos, como sería la formación de acantocitos y equinocitos, fueron observados y grabados. Las células incubadas solo en PBS mostraron mayor adhesión y presentó cambios morfológicos y cinéticos muy marcados, observándose a los 5 minutos eritrocitos microcíticos, hipocrómicos, globocitos, congregación y coagulación. En solución de PBS in vivo/vitro, se observan con poca movilidad o estáticos, volviéndose microcíticos e hipocrómicos en 5 minutos. A los 30 minutos y 28 días existió completa hemólisis

celular durante los primeros 60 minutos, a diferencia de aquellas incubadas con el extracto de acetona EPT que no se adhirieron unas a otras durante los 120 minutos del experimento, y en algunos casos las células permanecieron separadas unas de otras hasta por 48 horas (datos no determinados) (Fig. 29A – J, Gráfica 5) sin cambios mayores en su morfología.

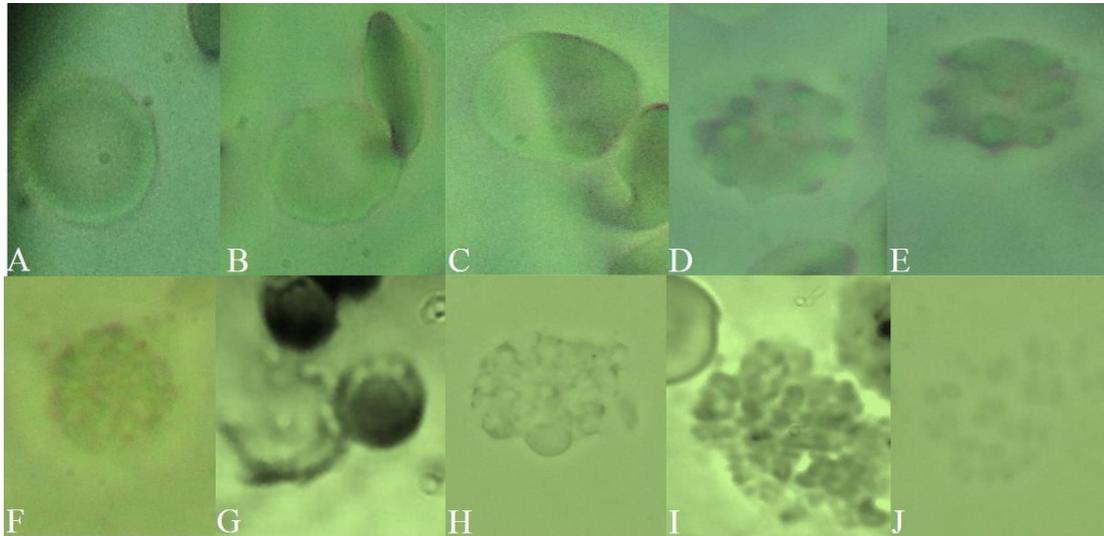
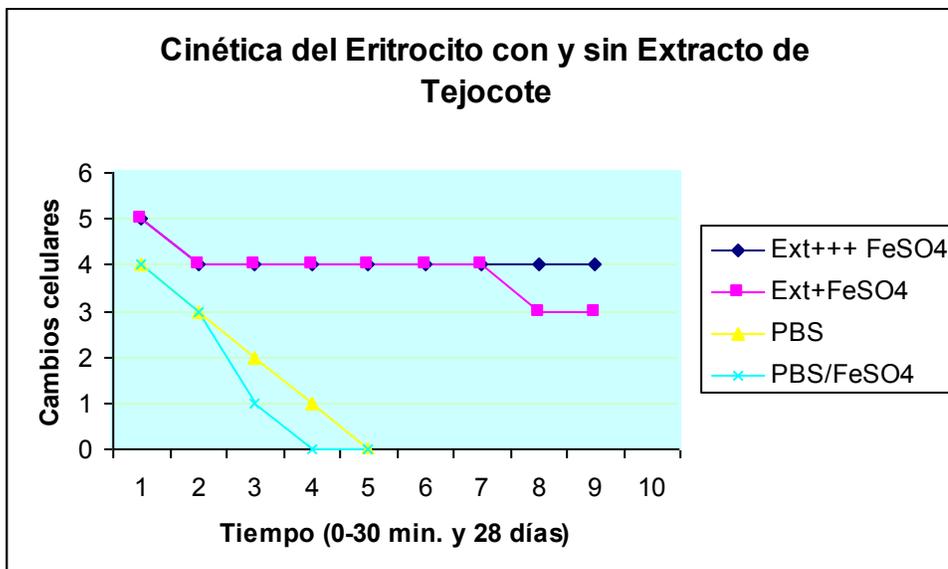


Fig. 29. Cambios morfológicos representativos de un eritrocito *in vitro* posterior a la exposición en extracto de acetone EPT a 100 mg/L. en un lapso de tiempo de 180 minutos en el canal de flujo. La eriptosis se retardo comparándola con una célula del grupo control (no mostrada). (A) normocito, (B) inicio de la fase I, (C) inicio y crenación de la fase II, (D) formación de acantocito y bebbing en la fase II, (E) equinocito en el inicio de la fase III, (F, G, and H) inicio d la formación de vesículas apoptóticas y disrupción de la membrana celular, (I) formación de esquistocitos, y (J) esquistocitos y lisis celular.

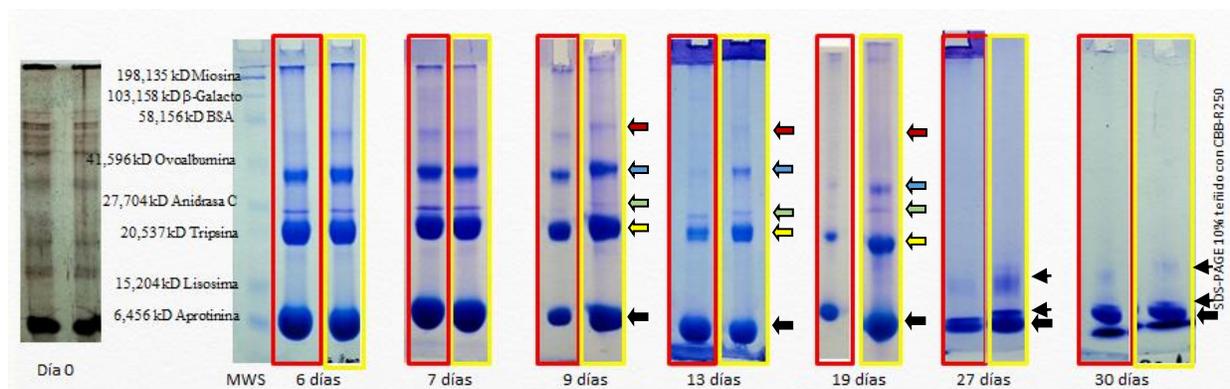
Es particularmente notable en este experimento, lo que sugiere que las CRS mantienen sus características morfológicas y micro-reológicas en las concentraciones micromolares en la que se utilizó el extracto de acetona EPT. Esto podría deberse a que no existe oxidación de lípidos o proteínas en la membrana celular de las CRS, por lo tanto no hay deshidratación ni crenación, lo que reduce la deformación celular y la viscosidad de su superficie, manteniendo su elasticidad y movilidad en el canal de flujo. Sin embargo, la vida media del eritrocito con o sin el extracto continuará su proceso de eriptosis, de aquí que poco a poco la célula perderá sus propiedades biológicas y finalmente el eritrocito será lisado.



Gráfica 5. Cinética y cambios morfológicos en el eritrocito con y sin extracto de tejocote: 5. Movilidad alta, normocítico, normocrómico; 4. Movilidad media, normocítico, normocrómico, espinocito, estomatocito, dacriocito; 3. Movilidad baja, normocítico, hipocrómico; 2. Movilidad nula, microcítico, hipocrómico, anisocitosis, poiquilocitosis, 1. Movilidad nula, microcítico, hipocrómico, cambios morfológicos; 0. Movilidad nula, cambios morfológicos, hemólisis celular. (Resultados de 8 experimentos)

VII.7. Análisis del eritrocito por electroforésis en geles de SDS-PAGE. El patrón de bandas de algunas proteínas del citoesqueleto de las CRS se tiñeron e identificaron en los geles de SDS-PAGE. La intensidad de tinción de las bandas se observaron en casi todos los diferentes tiempos de incubación de las CRS y con las diferentes concentraciones del extracto de tejocote. El análisis cualitativo mostró que algunas bandas mantienen su intensidad de tinción en relación a la mayor concentración del extracto de acetona EPT. En estos experimentos siete bandas principales se observaron al día 1 del experimento (**Fig. 30**).

La intensidad de color y el tamaño de algunas bandas se mantuvieron durante mayores períodos de tiempo y con mayor concentración del extracto, lo que sugiere un efecto protector antioxidante del extracto de acetona EPT en las proteínas del citoesqueleto de las CRS. Estas observaciones están relacionadas a los cambios observados en el curso del tiempo de incubación, en donde a mayor concentración del extracto es menor la lesión a las CRS. Esto soporta el hecho de que el citoesqueleto celular es protegido contra el daño oxidativo inducido por el FeSO₄, por lo tanto, las células mantienen su morfología y características reológicas sobre un mayor periodo de tiempo.



- Eritrocitos/PBS/FeSO₄ 10 mM
- Eritrocitos/PBS/FeSO₄ 10 mM / Extracto de acetona 100 ppm

Fig. 30. Análisis de la caracterización y mapeo del patrón molecular de las proteínas presentes en eritrocitos a diferentes tiempos de incubación con extracto de acetona de *Crataegus mexicana* a 100 ppm. Se observa que el número de bandas, la intensidad de tinción y grosor de algunas bandas se conservan durante mayor tiempo (flechas gruesas de color), mientras que otras bandas aparecen con el tiempo (cabeza de flecha). Geles de SDS-PAGE al 10%. En todos los experimentos se utilizó la misma cantidad de eritrocitos (células totales) en el día 0 (35 µg/5 µL por línea, y subsecuentemente 5 µL por línea).

Tabla 20. Distribución de las bandas y patrón molecular de las proteínas en las CRS con y sin el extracto de acetona EPT a diferentes tiempos.

Moléculas	Tiempo de incubación																
	1 h		día 6		día 7		día 9		día 13		día 19		día 27		Día 28		
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	
banda 1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Banda nueva								+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
banda 2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	+	-	-	-	-	-
banda 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	++	-	+	-	-	-	-	-
banda 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
banda 5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	+	+++	-	-	-	-	-
Banda nueva									+	+	-	+	-	-	-	-	-
Banda nueva												+	-	-	-	-	-
banda 6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Banda nueva													+	+	+	+	+
banda 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	++
Banda nueva												++	++	++	++	++	++

Valores son el número de bandas en las CRS indicadas en cada caso.
 * Moléculas clasificadas de acuerdo al tamaño y a la intensidad de la banda, como se describe en material y métodos.
 C = control CRS/PBS, E = experimental CRS/HPE
 n = 3

El patrón de las bandas se comparó entre las CRS en PBS, y las CRS en el extracto de acetona EPT, en un intento por determinar los efectos protectores antioxidantes dependientes del tiempo en las proteínas del citoesqueleto. El patrón de

bandeo de algunas proteínas se observaron en algunos casos hasta el día 28 si las proteínas de las CRS se incubaron con el extracto de acetona EPT, en comparación las proteínas en el grupo control sin el extracto fueron degradadas en menor tiempo, y algunas de ellas en algún punto de la incubación desaparecieron (**Fig. 31**). Debido a que el patrón de las bandas fue constante en cada una de las concentraciones, solo mostramos el patrón de las bandas con el extracto de acetona EPT a una concentración de 100 mg/L. Estas observaciones fueron cuantificadas (**Tabla 20**).

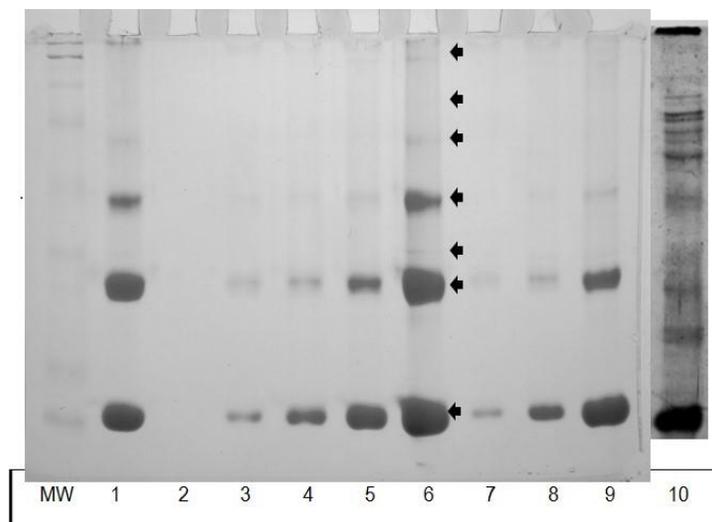


Fig. 31. Determinación de las proteínas de membrana en las CRS en un gel representativo de SDS-PAGE teñido con azul de coomassie brilliant blue R250. Diferencias y variabilidad en el patrón molecular (flechas) entre diferentes concentraciones del extracto de acetone EPT al día 7 (canal 1- CRS control, canal 2- PBS/FeSO₄, canal 3- CRS/EPT 10 mg/L, canal 4- CRS/EPT 30 mg/L, canal 5- CRS/EPT 50 mg/L, canal 6- CRS/EPT 100 mg/L), y día 14 (canal 7- CRS/EPT 10 mg/L, canal 8- CRS/EPT 30 mg/L, canal 9- CRS/EPT 50 mg/L), canal 10- CRS al día 1. Un μ L por canal de acuerdo a material y métodos. MW= marcador de peso molecular.

Singh y Rajini (2008), en un experimento similar, mostraron la actividad protectora antioxidante contra el ascorbato ferrosos utilizando extracto de piel de papa en diferentes concentraciones, pero no determinaron cambios dependientes del tiempo de incubación. Esto hace más claro que incubar a las CRS en extractos que contengan polifenoles mejora el efecto antioxidante sobre las proteínas del citoesqueleto celular. Algunos pro-oxidantes como el H₂O₂, Fe₂₊-ascorbato y el AAPH son capaces de inducir alteraciones en la membrana del eritrocito, disminuyendo las proteínas del

citoesqueleto que generan una serie de cambios en la morfología y propiedades reológicas de las células (Battistelli y cols., 2005; Srour y cols., 2000). En el presente trabajo de investigación, el uso del pro-oxidante FeSO_4 es responsable del ataque oxidativo, induciendo estos cambios y la subsecuente fragmentación no enzimática de las proteínas y la deformación de la membrana, pero es importante mencionar que el extracto de acetona EPT de *C. mexicana* es capaz de proteger a las células rojas de la sangre contra el daño oxidativo, disminuyendo los cambios morfológicos y retrasando el proceso de eritosis y la hemólisis.

VIII. DISCUSIÓN

El tejocote *Crataegus mexicana* es una fuente natural de antioxidantes polifenólicos (García-Mateos y cols., 2012). Los extractos de acetona derivados de *Crataegus mexicana* fueron capaces de inhibir el estrés oxidativo inducido por el prooxidante FeSO_4 en las CRS. Esto se demostró y confirmó por el análisis de TBARS, las evidencias en la morfología celular y el patrón de las proteínas en los geles de electroforesis usando diferentes concentraciones del extracto. Los resultados con TBARS mostraron una relación directa, con bajas dosis del extracto de acetona EPT para inhibir la formación de MDA, durante la peroxidación lipídica inducida por el FeSO_4 en las CRS. Estos resultados son similares a los demostrados en previos estudios utilizando homogeneizados celulares del cerebro de rata (Méndez y cols., 2013).

El FeSO_4 induce lesiones en la membrana celular, hemólisis y cambios morfológicos en las CRS. Sin embargo, con la presencia a diferentes concentraciones del extracto de acetona EPT se inhibieron estos cambios y daños celulares, extendiendo la vida media del eritrocito bajo las condiciones experimentales utilizadas. Los cambios morfológicos asociados con el proceso de eryptosis se retardaron durante el tiempo que duró el experimento. Las células crenadas, los acantocitos y equinocitos se observaron por mayor periodo de tiempo, antes de presentarse el proceso de hemólisis y que la formación de esquistocitos se llevara a cabo, lo que indica un retardo en la eriptosis. Esta protección otorgada por el tejocote se observe durante las primeras 24 h del experimento, comparándolo con el grupo control en donde la eriptosis y la vida media del eritrocito son significativamente más rápidas.

Zhu y cols. (2005) determinaron el efecto antioxidante protector en ratas que consumieron cocoa inhibiendo la hemólisis de los eritrocitos hasta por 240 minutos en diferentes concentraciones, sugiriendo que algunos polifenoles se unen a la membrana de los eritrocitos. Nuestro estudio también demostró la inhibición por largos periodos de tiempo de los cambios morfológicos y la hemólisis inducida por el FeSO_4 , con diferentes concentraciones hasta por 28 días. Estos resultados confirman el hecho de que los polifenoles en el fruto de tejocote mejoran el efecto protector antioxidante en las CRS, actuando de manera interactive en la bicapa lipídica de la célula.

Los cambios en el número, movilidad relativa e intensidad de tinción en las bandas de las proteínas observadas en los geles de electroforésis indican que las proteínas del citoesqueleto son susceptibles de ser oxidadas por el pro-oxidante FeSO_4 durante la vida del eritrocito bajo las condiciones experimentales. Aún más, las CRS incubadas con las diferentes concentraciones del extracto de tejocote mostraron un mayor número de bandas y la conservación de las bandas y la intensidad de tinción fue más intensa en algunas proteínas durante los diferentes tiempos del experimento. Esto podría indicar que el extracto de tejocote contribuye de alguna manera en la inhibición de la oxidación de proteínas por un mayor periodo de tiempo, probablemente protegiendo los grupos $-\text{SH}$ de las proteínas contra la oxidación. También pueden inhibir la habilidad de la proteasas de degradar formas oxidadas de otras proteínas, y por lo tanto incrementar la resistencia celular al estrés oxidativo (Asgary y cols., 2005).

El retraso en la oxidación de proteínas y su polimerización tienen una relación en la estabilidad y la morfología del eritrocito. La membrana bilipídica y la estabilidad de las proteínas podría estar relacionada a las concentraciones de antioxidantes presentes en el extracto de acetona EPT de *Crataegus mexicana*, reduciendo la deshidratación celular, la pérdida de K y otros cambios osmóticos (Wandersee y cols., 2005). Esta protección en las proteínas del citoesqueleto se relaciona a la mejor forma y tamaño del eritrocito, comparándolo con aquel sin extracto de tejocote de *Crataegus mexicana*. La reducción que se observó en el número e intensidad del patrón de las bandas, podría estar relacionado al incremento de la proteólisis o la inestabilidad de las bandas, lo que no sería considerado totalmente cierto dadas las observaciones que fueron similares en todos los experimentos con las CRS, comparándolas con las CRS con o sin el extracto de acetona EPT. La fisiopatología de estos cambios deberá ser determinada en futuros estudios utilizando antioxidantes purificados.

La deformación de las CRS es un factor importante en la reología de la sangre (Bronkhorst y cols., 1995; Dupire y cols., 2012) y está relacionado a propiedades importantes de las células, flujo sanguíneo y enfermedades de la sangre. La deformación es el resultado de diferentes propiedades mecánicas y geométricas de las CRS, y es determinante para la estabilidad de los lípidos de la membrana y las proteínas del citoesqueleto de la célula. La consecuente disrupción del citoesqueleto de

la membrana por cualquier proceso oxidativo podría ser el responsable de la formación de las burbujas (bebbing) en las CRS (Liu y cols., 2012; Spangler, 2011). Además, el estrés hidrodinámico y la oxidación de proteínas y fosfolípidos también puede inducir cambios morfológicos y reológicos en la célula. Los extractos de acetona de *Crataegus mexicana* fueron capaces de inhibir el estrés oxidativo, manteniendo la integridad estructural y la morfología de las células, con menos cambios y daños en la morfología del eritrocito bajo las condiciones experimentales. El extracto de acetona EPT retarda el proceso de eriptosis, así como la formación de células crenadas e incrementando la velocidad de flujo del eritrocito, contribuyendo a la movilidad de la célula y evitando el costoso gasto energético por oxidación y la deformación, manteniendo la forma y la elasticidad celular. Esto podría deberse a la presencia de metabolitos antioxidantes en el extracto de acetona EPT. Esta propiedad del tejocote podría utilizarse para contribuir a evitar la adhesión de los eritrocitos y la vasooclusión en el torrente sanguíneo presentes en muchas enfermedades de la sangre, y para inhibir la lipoperoxidación de las biomembranas que pueden inducir un daño por la reperfusión isquémica, inflamación y envejecimiento.

Por otro lado, es bien conocido que los equinocitos se forman a los 3 ó 4 días en sangre total mantenida a 4° C, y a las 24 horas en sangre incubada a 37° C (Brecher y Bessis, 1972), pero con el extracto de acetona EPT, las células crenadas, los acantocitos y equinocitos se formaron tardíamente. Comparándolas con el grupo control y la forma de la membrana celular, se mantuvo hasta por 28 días mostrando la inhibición estos cambios morfológicos. Posiblemente, el proceso oxidativo en las células se inhibe por los antioxidantes presentes en el extracto, que mantienen la morfología de la célula y su vida media reduciendo el proceso de eriptosis.

La disminución de la lesión en las CRS fue demostrado en nuestro estudio, siendo similar a lo reportado por Baek y cols. (2012) en cuyos de guinea sometidos a una terapia con haptoglobina. Se debe considerar que el extracto de tejocote es un producto natural que puede ser consumido regularmente por el ser humano en condiciones de salud y enfermedad. Wautier y cols. (1981) mencionaron el incremento de la adhesión de los eritrocitos en células endoteliales en pacientes con diabetes mellitus y su relación con complicaciones vasculares, por lo tanto, la aplicación

nutraceútica del tejocote *Crataegus mexicana* podría inhibir la adhesión, manteniendo la membrana celular de la CRS de ser oxidada por los radicales libres.

Los resultados de este trabajo concuerdan ampliamente con reportes previos publicados relacionados a la capacidad anti-oxidante de otras frutas y extractos vegetales, como es la cáscara de tejocote, extractos de cocoa, y aceites de semillas. Una amplia variedad de evidencias implica al estrés oxidativo en la patogénesis de muchas enfermedades de las células de la sangre, alterando su tiempo de vida, acortando el proceso de eritrosis e incrementando el proceso de hemólisis. Este proceso podría también ser resultado de una respuesta sistémica inflamatoria. Por lo tanto, la hipótesis planteada en este trabajo está de acuerdo en que el tejocote tiene efectos protectores en la morfología y vida media del eritrocito, debido posiblemente a la presencia y acción sola o en conjunto de moléculas antioxidantes en el extracto de acetona EPT. Estos resultados están relacionados al consumo de tejocote en México y otros países desde tiempos remotos, para tratar enfermedades de la sangre y sistémicas. Sin embargo, muchas de estos compuestos y su interacción permanece por ser explorada experimentalmente.

IX. CONCLUSIONES

1. De cada 500 g de tejocote (*Crataegus mexicana*) se obtuvo un total de 38.8 g de epidermis liofilizada. De 30 g de muestra biológica se obtuvieron 2.222 g de extracto de acetona. De esta manera por cada kilogramo de fruta se obtienen 67.62 g de epidermis seca y a su vez 4.44 g del extracto de acetona (acetona EPT). El total de polifenoles en 2.222 g de epidermis seca fue de 0.68 ± 0.001 mg. El IC_{50} para reducir radicales libres fue de 15.26 ± 0.20 mg/L.
2. La epidermis liofilizada de tejocote *Crataegus mexicana* a una concentración de 100 mg/L, inhibe la lipoperoxidación en los eritrocitos humanos en un 47.91%, utilizando la técnica de TBARS.
3. El extracto de tejocote de *Crataegus mexicana*, retarda las alteraciones morfológicas durante la eriptosis *in Vitro* y *ex Vivo* y ofrece una protección significativa de la membrana celular inferida por la conservación de sus características morfológicas y reológicas hasta por 28 días.
4. Los experimentos mostraron un patrón molecular en geles de electroforésis constante, observandose que algunas proteínas con el extracto de acetona se conservan a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.

X. PERSPECTIVA

Existe la necesidad de identificar compuestos nuevos y más efectivos en muchas frutas de consumo tradicional, como las que se consumen en la gastronomía mexicana, y como actúan sus constituyentes en contra del estrés oxidativo en las células, tejidos y enfermedades del ser humano. La variedad de frutas y sus partes en la inhibición y remoción de ERO y radicales intermedios en sus diferentes formas, conlleva el continuar la purificación de antioxidantes en frutas mexicanas y determinar sus mecanismos de acción en lípidos y proteínas de las células rojas de la sangre.

XI. REFERENCIAS

1. Aebi H, Bossi E, Cantz M, Matsubara S, Suter H. 1968. A catalasemia in Switzerland. En: Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism (Ed) Beutler E: 41-65.
2. Alexander RR, Griffiths JM, Wilkinson ML. 1984. *Basic Biochemical Methods*. Wiley-Interscience Publication (NY).
3. Alexandrakis M, Singh L, Boucher W, Letourneau R, Theoflopoulos P, Theoharides TC. (1999) Differential effects of flavonoids on inhibition of secretion and on accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *Int J Immunopharmacol* 21:379–390.
4. Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*; 99: 325-348.
5. Argeta VA, Cano AL. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. pp. 1322-1323.
6. Arrieta JD, Siles-Barrios J, García-Sánchez B, Reyes-Trejo and Sánchez-Mendoza ME. 2010. Relaxant effect of the extracts of *Crataegus mexicana* on guinea pig tracheal smooth muscle. *Pharmacogn Journal*; 2: 40-46.
7. Asgary S, Naderi GH, Askaris N. 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clinical Cardiol*. 10: 88-90.
8. Asgary S, Naderi GH, Sadehi M, Kelishadi R, Amiri M. 2004. Antihypertensive effect of Iranian *Crataegus curvisepala* Lind: a randomized, double-blind study. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*. 30: 221-225.
9. Baek JH, D'Agnillo F, Vallelian F, Pereira CP, Williams MC, Jia Y, Schaer DJ, Buehler PW. 2012. Hemoglobin-driven pathophysiology is an in vivo consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy. *J. Clin. Invest*. 122: 1444-1458.
10. Ballas SK. 1977. Abnormal erythrocyte membrane protein pattern in severe megaloblastic anemia. *Clin. Res*, 25: 333.
11. Basu AK, O'Hara SM, Valladier P, Stone K, Mols O, Marnett LJ. 1988. Identification of adducts formed by reaction of guanine nucleosides with malondialdehyde and structurally related aldehydes. *Chem. Res. Toxicol*. 1: 53-59.
12. Battistelli M, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiari L, Dachá M, Goobi P. 2005. *Rhodiola rosea* as antioxidant in red blood cells: ultra-estructural and hemolytical behaviour. *Eur J Histochem*, 49: 243-254.
13. Baumann J, Wurm G, von Bruchhausen VF. 1980. Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their O₂⁻ scavenging properties. *Arch Pharm* 313:330–337.
14. Bhooshan-Pandey K, Ibrahim-Rizvi S. 2011. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*; 155: 131-136.
15. Brecher G, Bessis M. 1972. Present status of speculated red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation. A critical review. *Blood*; 40: 333-343.
16. Bronkhorst PJH, Streekstra GJ, Grimbergen J, Nijhof EJ, Sixma JJ, Brakenhoff GJ. 1995. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys. J*. 69: 1666-1673.
17. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. 2002. Evidence of oxidative stress in human

- corneal diseases. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 341–51.
18. Cabrera LG. 1992. Diccionario de Aztequismos. Ediciones Colofón. Distrito Federal, México. p: 166.
 19. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74: 2157-2184.
 20. Calışkan O, Gündüz K, Serçe S, Toplu C, Kamilođlu O, Őengül M, Erciřli S. 2012. Phytochemical characterization of several hawthorn (*crataegus* spp.) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Pharmacogn. Mag.* 8:16-21.
 21. Callaway JK. 1998. A reliable procedure for comparison of antioxidants in rat brain homogenates. *Journal of Pharmacology Toxicology Methods.* April; 39:155-62.
 22. Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic. Biol. Med.* 9:441–449.
 23. Cañas P, Olivares M, Celedón C, Llaguno S, Valenzuela A. 1988. Actividad del sistema de defensa antioxidante y agresión oxidativa en eritrocitos de recién nacidos de bajo de peso y distintas edades gestacionales. *Rev. Chil. Pediatr.* 59: 83-88.
 24. Cárdenas N, Pedraza J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. Educación química. Vol. 17: pp 164-173.
 25. Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. 1996. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications of coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1624-1629.
 26. Celebi Kocyildiz Z, Birman H, Olgac V, Arkgün-Dar K, Melikoglu G, Mericli HA. 2006. *Crataegus tannacetifolia* leaf extracts prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytotherapy Research.* 20: 66-70.
 27. Chapple ILC, Matthews JB. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 43: 160-232.
 28. Cheng Z, Li Y. 2007. What is responsive for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update. *Chem. Rev.* 107: 748-746.
 29. Coimbra S, Castro E, Santos-Silva A. 2006. Disminución de estrés oxidativo en relación con el consumo de té verde. *Clinical Nutrition.* 25: 790-796.
 30. Daisuke E, Yasumasa E, Koichiro I, Tetsuji A, Naofumi T, Takaaki T, Manabu M. 2010. Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. *Archs oral Biol.* 55: 170-176.
 31. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18.
 32. De la Cal C, Lomniczi A, Mohn CE, De Laurentiis A, Casal M, Chiarenza A. 2006. Decrease in salivary secretion by radiation mediated by nitric oxide and prostaglandins. *Neuroimmunomodulation.* 13: 19–27.

33. Domínguez M, Nieto A, Marín JC, Jeffery E, Céspedes CL. 2005. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *J Agric Food Chem*; 53: 5889-5895.
34. Dupire J, Socol M, Viallat A. 2012. Full dynamics of a red blood cell in shear flow. *PNAS*; 109: 20808-20813.
35. Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. 2012. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*. 79: 5-26.
36. Elchuri S, et al. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24: 367-380.
37. 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: 1-16.
38. Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Methods Enzymol*; 186, 407-421.
39. Estrada-Flores E, Peralta-Zamora L, Rivas-Manzano P. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT Editor S.A. (México); pp. 17, 19, 38-44, 49-52, 63, 115.
40. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606-2617.
41. Folin C, Ciocalteu V. 1927. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J Biol Chem*. 73: 627-650
42. 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: 61-66.
43. Froehlichera T, Hennebelle T, Martin-Nizard F, Cleenewerck P, Hilbert JL, Trotin F, et al. 2009. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem*. 115: 897-03.
44. García-Mateos R, Aguilar-Santelises L, Soto-Hernández M, Nieto-Angel R, Kite G. 2012. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *Crataegus* spp. from Mexico. *Agrociencia*; 46: 651-662.
45. Geneser F. 2001. Sangre. En: Histología, Tercera ed. Ed. Médica Panamericana (España): 235-256.
46. Geronikaki AA, Gavalas MA. 2006. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 425- 442.
47. Gunalan K, Gao X, Liew KJL, Preiser PR. 2011. Differences in erythrocyte receptors specificity of different parts of the *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 2A. *Infection and Immunity*. 79: 3421-3430.
48. Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 186:1-85.
49. Harborne JB. 1988. Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships. In plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties. Eds: Cody V, Middleton E Jr, Harborne JB (Alan

R. Liss, Inc. New York), pp 17-28.

50. Heebel RP, Leung A, Mohandas N. 1990. Oxidation-induced changes in microrheologic properties of the red blood cell membrane. *Blood*. 76: 1015-1020.
51. Higareda RA, Salazar-Montoya MJA, Ramos-Ramírez EG. 1995. Conservación poscosecha del tejocote (*Crataegus mexicana*). *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 4.
52. Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP. 1996. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood*. 87:4879-4886.
53. Inokuchi JK, Okabe T, Yamauchi T, Nagamatsu A. 1984. Inhibitors of angiotensin converting enzyme in crude drugs. *Chemical and pharmaceutical Bulletin*. 32: 3615-3619.
54. Janero D. 1998. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med*. 9:515-540.
55. Jangde R. 2011. An Overview of Resealed Erythrocyte for Cancer Therapy. *Asian J. Res. Pharm. Sci*. 1: 83-92.
56. Kempe DS, Lang PA, Durantón C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F. 2006. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *Faseb J*. 20: 368-370.
57. Khattak KF, Simpson TJ, Ihasnullah. 2008. Effect of gamma irradiation on the extraction yield, total phenolic content and free radical-scavenging activity of *Nigella stiva* seed. *Food Chem*. 110: 967-972.
58. Kibanova D, Nieto-Camacho A, Cervini-Silva J. 2009. Lipid peroxidation induced by expandable clay minerals. *Environ Sci Technol*; 43: 7550-7555.
59. Kim HJ, Chen F, Wang X, Chung YH, Jin Z. 2005. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L) oil and identification of its antioxidant constituents. *J Agric Food Chem*. 53: 7691-7695.
60. Kirakosyan A, Kaufmana P, Warberb S, Zickb S, Aaronsonb K, Bollingb S, Chul Chang S. 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiology Plantarum*. 121: 182-186.
61. Konigsberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Edit. Manual Moderno (México).
62. Kowalczyk E, Kowalczyk J, Blaszczyk J, Gwozdinzki L, Ciecwierni J, Sienkiewicz M. 2012. Estimation of cell membrane properties and erythrocyte red-ox balance in patients with metabolic syndrome. *Mol Biol Rep*. 39: 11113-11118.
63. Krishnaveni G, Krishnamoorthy B, Muthukumar M. 2013. Future Prospectus in Targeting Drug Delivery: A Review on Resealed Erythrocytes - A Promising Carrier. *Sch. Acad. J. Pharm*. 2: 81-88.
64. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, and Lubin BH. 1996. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*. 87: 1179-1187.
65. Kwon T, Watts B. 1964. Malonaldehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation in foods.

Journal of food science. 29: 294-302.

66. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 277: 680-688.
67. Lam RYY, Woo AYH, Leung PS, Cheng CHK. 2007. Antioxidant actions of phenolic compounds found in dietary plants on low-density lipoprotein and erythrocytes in vitro. *J. Am. Coll. Nutr.* 26: 233-242.
68. Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T. 2006. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 8: 1183-1192.
69. Liu L, Yang W, Fu J, Yu M, Huang Q, Wang D, Xu J, Chun D, Yao P, Huang F. 2012. Effects of flaxseed oil on anti-oxidative system and membrane deformation of human peripheral blood erythrocytes in high glucose level. *Lipids Health Dis.* 11: 88.
70. Ljunbuncic P, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. 2005. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *J. Ethnopharmacol.* 101: 153-161.
71. Long SR, Carey RA, Crofoot KM, Proteau PJ, Filtz TM. 2006. Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine.* 13: 643-650.*
72. 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: 97-111.*
73. Lotito SB, Frei B. 2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: Contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 201-211.
74. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
75. Luna EJ, Hitt AL. 1991. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science.* 258:955-964.
76. Luna LG. 1960. Manual of Histology Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Edit. McGraw-Hill. Third Edition (New York): pp. 1-3, 32-39.
77. Luna-Suárez S, Tapia-López L, López-Valdez F. 2010. Efecto del tipo de secado de tejocote sobre el contenido de polifenoles y su comparación con corteza de dos frutos. *XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Univ de Guanajuato.* Resumen: FH11-FH14.
78. Lynch RE, Lee GR, Cartwright GE. 1976. Inhibition of superoxide dismutase of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. *J Biol Chem.* 251:1015-1018.
79. Mackenzie SB. 2000. El eritrocito. En: Hematología Clínica, Segunda ed. Ed. El Manual Moderno (México): 39-60.
80. Mangiapane H, Thomson J, Salter A, Brown S, Bell GD, White DA. 1992. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavanoid. *Biochem. Pharmacol.* 43: 445-450.
81. Mata A, Marques D, Martínez M, Silveira J, Marques J, Mesquita M, Pariente JA, Salido GM, Singh J. 2008. Effect of hydrogen on secretory response, calcium mobilization and caspase-3 activity in the insolate rat parotid gland. *Mol Cell Biochem.* 319: 23-31.

82. Mataix J. 2009. Tratado de Nutrición y alimentación: Situaciones Fisiológicas y Patológicas. *Edit.* Oceano Ergon. Barcelona (España).
83. Matteucci E, Cocci F, Pellegrin L, Gregori G, Giampietro O. 1995. Measurement of ATPase in red cells: setting up and validation of a highly reproducible method. *Enzyme Protein.* 48: 105-119.
84. Mayor R. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defense antioxidante. *Rev. Instituto de Medicina Tropical.* 5:23-29.
85. 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.
86. Middleton IJ, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52: 673-751.
87. Miller AL. 1998. Botanical influences on cardiovascular disease. *Alternative Medicine Review.* 3: 422-431.
88. Min BS, Huong HTT, Kim JH, Na MK, Lee HK, Bae K, Kang SS. 2004. Furo-1,2-naphthoquinones from *Crataegus pinnatifida* with ICAM-1 expression inhibition activity. *Planta Medica.* 70: 1166-1169.
89. Muller, et al., F. L. 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.
90. Nagler RM, Salameh F, Reznick AZ, Livshits V, Nahir AM. 2003. Salivary gland involvement in rheumatoid arthritis and its relationship to induced oxidative stress. *Rheumatology (Oxford).* 42: 1234-41.
91. Naim M, Gestetner B, Bondi A, Birk Y (1976) Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J Agric Food Chem* 24:1174-1177.*
92. Naito Y, Lee MC, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. 2010. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine.* 7: 36-44.
93. Ng TB, Liu F, Wang ZT. 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci;* 66: 709-723.
94. 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.
95. Nieto-Ángel R, Borys MW. 2008. Germoplasma y usos del tejocote en México. *Enfoques tecnológicos en la fruticultura.* UACH. México.
96. Nieto-Ángel R, Borys MW. 1993. El tejocote (*Crataegus spp*); un potencial frutícola de zonas templadas. *Revista Fruticultura Profesional;* 54: 64-71.
97. Nugraheni M, Santoso U, Suparmo, Wuryastuti H. 2011. In vitro antioxidant, antiproliferative and apoptosis effect of *Coleus tuberosa* L. *Afr J Food Sci;* 5: 232-241.
98. 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: 141-153.
99. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem;* 95: 351-358.
100. Organización Panamericana de la Salud. 1983. Manual de técnicas básicas para un laboratorio de salud. Edit. OPS.

101. Özcan M, Hacseferogullari H, Marakoglu T, Arslan D. 2005. Hawthorn (*Crataegus spp*) Fruit: Some physical and chemical properties. *J. Food Eng.* 69.
102. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. 2006. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 136: 6-22.
103. Pandey KB, Rizvi SI. 2011. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac.* 155: 131-136.
104. Pérez-Lizaur AB, Palacios-González B. 2009. Sistema de alimentos equivalentes para pacientes renales. Edit. Ogali y Fomento de nutrición y salud A.C. México. pp 22.
105. Peschel W, Bohr C, Plescher A. 2008. Variability of total flavonoids in *Crataegus* – Factor evaluation for the monitored production of industrial starting material. *Fitoterapia.* 79.
106. Phipps JB. 1983. Biogeographic, taxonomic, and cladistic relationships between East Asiatic and North American *Crataegus*. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 70: 667-700
107. Phipps JB. 1997. Monograph of northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany.* 15:1-94.
108. Phipps JB, O'Kennon RJ, Lance RW. 2003. Hawthorns and medlars. Timber Press, Portland, USA. p: 139.
109. Quintanar-Escorza MA, Calderón-Salinas JV. 2006. Eriptosis, la apoptosis del eritrocito. *REB.* 25: 85-89.
110. Rajendra Jangde. 2011. An Overview of Resealed Erythrocyte for Cancer Therapy. *Asian J. Res. Pharm. Sci.;* 1: 83-92.
111. Rhoades R, Pflanzer R. 1992. Functions of the blood. In: Human Physiology, Second ed. Ed. Saunders (USA): 576-593.
112. Rigelsky JM, Sweet BV. 2002. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. *American Journal of Health-System pharmacy;* 59:417-422.
113. Salama A, Mueller-Eckhardt C. 1987. Cianidanol and its metabolites bind tightly to red cells and are responsible for the production of auto- and/or drug-dependent antibodies against these cells. *Br J Haematol* 66:263–266.
114. Salawu SO, Akindahunsi AA, Sanni DM, Decorti G, Cvorovic J, Tramer F, Passamonti S, Mulinacci N. 2011. Cellular antioxidant activities and cytotoxic properties of ethanolic extracts of four tropical green leafy vegetables. *Afr J Food Sci;* 5: 267-275.
115. Salvolini E, Martarelli D, Di Giorgio R, Mazzanti L, Procaccini M, Curatola G. 2000. Age-related modifications in human unstimulated whole saliva: a biochemical study. *Aging (Milano).* 12:445–8.
116. Schemedes A, Holmer G. 1987. A new TBA method for determining free MDA and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *JAOCS;* 66: 813-7.
117. Schuh J, Faitclough CF, Haschemeyer RH. 1975. Oxygen mediated heterogeneity of apoprotein low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA;* 3173-7.
118. Shao-Jiang S, Ling-Zhi L, Pin-Yi G, Peng Y, Jing-Yu Y, Chun-Fu W. (2011). Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Food Chem.* 129: 933–939.
119. Singh N, Rajini PS. 2008. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against

- oxidative damage. *Chem Biol Interact.* 173: 97-104.
120. Skegret M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonic M, Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones, and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198.
 121. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. 1984. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta* 799:313–317.
 122. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. 1988. Cooperation of quercetin with ascorbate in the protection of photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol* 48:95–199.
 123. Spangler EJ. 2011. Computer simulation of blebbing in erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Conference On Undergraduate Research (NCUR)*. Ithaca College, New York.
 124. Srour T, Bילו YY, Juma M, Irhimeh MR. 2000. Exposure of human erythrocytes to oxygen radicals causes loss of deformability, increased osmotic fragility, lipid peroxidation and protein degradation. *Clin Hemorrhol Microcirc* 23: 13-21.
 125. Takahama U. 1983. Suppression of lipid photoperoxidation by quercetin and its glycosides in spinach chloroplasts. *Photochem Photobiol* 38:363–367.
 126. 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.
 127. Toth KM, Clifford DP, Berger EM, White CW, Repine JE. 1984b. Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxide-mediated damage to isolated perfused rat lungs and culture bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest.* 74:292-295.
 128. Touyz R. 2005. Estrés oxidativo en la hipertensión arterial. *Boletín del Consejo Argentino de HTA*; 6:22-9.
 129. Ugartondo-Casadevall V. 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis, Facultat de Farmacia, Departament de Fisiologia. Universitat de Barcelona. pp 193-212.
 130. Urbonaviciute A, Jakstas V, Kornysova O, Janulis, Maruska A. 2006. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *Journal of Chromatography A.* 1112: 339-344.
 131. Valenzuela A, Videla LA. 1983. Citotoxicidad del oxígeno, aspectos biológicos y médicos. *Rev Med Chile*; 111: 756-759.
 132. 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.* 26:1236-1241
 133. Venereo-Gutiérrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*; 31: 1-7.
 134. Van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, Schwartz BA, Moldow CF, Jacob HS. 1985. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: Role of red cell glutathione. *Science*; 227:756-759.
 135. Villa-Caballero L., et al. 2000. Oxidative stress. Should it be measured in the diabetic patient? *Gac Méd Méx*; May-June, 136: 249-56.

136. Wali RK, Jaffes S, Kumar D, Sorgente N, Kalra VK. 1987. Increased adherence of oxidant-treated human and bovine erythrocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*; 133: 25-36
137. Wandersee NJ, Punzalan RC, Rettig MP, Kennedy MD, Pajewski NM, Sabina RL, Scott JP, Low PS, Hillery CA. 2005. Erythrocyte adhesion is modified by alterations in cellular tonicity and volume. *Br. J. Haematol.* 131: 366-377.
138. Wautier JL, Paton RC, Wautier MP, Pintigny D, Abadie E, Passa P, Caen JP. 1981. Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications. *N Engl J Med*; 305: 237.
139. Willet CW. 1994. Diet and health: What should we eat? *Science.* 264: 532-537.
140. Winterbourn CC, Stern A. 1987. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *J Clin Invest*; 80:1486-1491.
141. Zakai N, Kulka RG, Loyter A. 1977. Membrane ultrastructural changes during calcium phosphate-induced fusion of human erythrocyte ghosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 2417-2421.
142. Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. 2002. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp. Biol. Med.* 227: 321-329.
143. Zhu QY, Schramm DD, Gross HB, Holt RR, Kim SH, Yamaguchi T, Kwik-Urbe CL, Keen CL. 2005. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin. Dev. Immunol.* 12: 27-34.

XII. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aducto. Es la adición de un reactivo en los extremos de un sistema conjugado. Los dienos conjugados producen aductos 1,4 cuando se tratan con electrófilos.

Deletéreo. Sustancia que es nociva o perjudicial.

Deshidratación celular. Causado por la pérdida de K⁺ intracelular y por consiguiente la salida osmótica de agua intracelular.

Electronegatividad. Está ligada a la polaridad de un átomo, el átomo atrae electrones al núcleo (F, O).

Enol. Alcohol vinílico (eno + ol) que esta en equilibrio con un compuesto carbonilo. Compuestos acuosos intermediarios de una reacción con un grupo –OH unido a un carbono vinílico.

Enolizado. Formación de un enol.

ERO. Especie Reactiva de Oxígeno

Escramblasa. Enzimas traslocadoras de fosfolípidos

Fenol. Nombre genérico del hidroxibenceno, Compuestos que tienen grupos hidroxilos unidos a anillos aromáticos.

Formaldehído. Es un gas flamable que a temperatura ambiente tiene un olor sofocante muy picante. Es muy soluble en agua, alcohol y éter. Se combina con varias sustancias y polimeriza fácilmente.

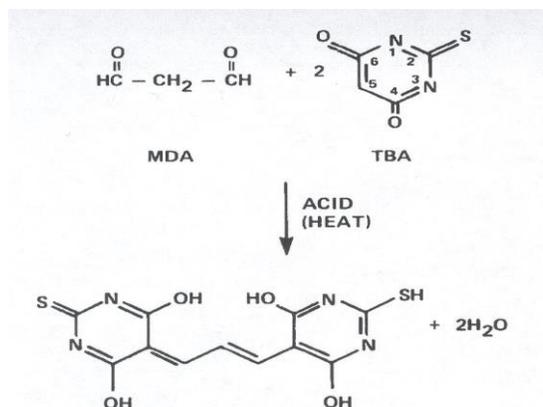
Formol ó formalina. El uso de formol en solución acuosa como fijador de elección, fue utilizado por Tillant en 1892 y Blunt en 1893. Es un agente reductor orgánico que proviene del formaldehído (gas). Forma enlaces entre cadenas proteínicas adyacentes, principalmente a los grupos amino, imino, amido, péptido, guanidilo, hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo, y anillos aromáticos, pero no las precipita. Conserva las grasas y lípidos complejos, pero no así en grasas neutras. Se prepara solo (10%) o amortiguado con fosfato de sodio monobásico y dibásico.

Hematoxilina-Eosina (HE). Técnica de tinción histológica descubierta por Wilhem Waldeyer en 1863, quien utilizo la fucsina y extracto de palo de Campeche (hematoxilina). Posteriormente la combinación de HE fue perfeccionada por Carl David Wilhem Busch en 1877, por Renalt en 1879, y por William Stirling en 1881. La hematoxilina (Hematoxilon campechianum) es un colorante básico natural, y la Eosina es un colorante ácido.

Malondialdehído.

^a **TBA.** Ácido tiobarbitúrico: 2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-Dione: C₄H₄N₂O₂S. Es un compuesto orgánico y un heterocíclico.

^b El MDA forma un aducto 1:2 con el TBA y forma lo siguiente:



Polar. Propiedad de las moléculas que representa la separación de las cargas eléctricas en la misma. Está íntimamente relacionada con otras propiedades como la solubilidad, el punto de fusión, el punto de ebullición, las fuerzas intermoleculares, etc. El NaCl es muy buen ejemplo de una molécula polar, y por eso puede disociar con el agua, el cual a la vez es sumamente polar. El agua, por ejemplo, es una molécula fuertemente polar ya que los momentos dipolares de los enlaces dispuestos en "V" se suman ofreciendo una densidad de carga negativa en el oxígeno y dejando los hidrógenos casi sin electrones.

Solución Polar o disolvente polar. Solo disuelve otras sustancias polares y un disolvente apolar solo disuelve sustancias apolares, "semejante disuelve a semejante".

Polaridad	(-)	<i>n</i> -hexano	No polar con no polar	
		Dicloroetano	Carotenos	
		Acetato etilo	Polifenoles Triterpenos	
		Acetona		
		Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	
		Metanol	CH ₃ OH	Antocianinas Flavonoides Glucosilados Flavonoides
		Agua	H ₂ O	
(+)			Polar con polar	

Tamaño celular. Dimensión o medida de la célula por su longitud, altura o anchura. Cuando se miden dos dimensiones se refiere a la superficie de la célula.

Tonicidad celular. Capacidad del eritrocito de contraerse parcialmente, de manera pasiva y continua. Se asocia a la reología entre el esfuerzo y la deformación celular, cuando la célula fluye en la sangre. Se asocia a la elasticidad reversible del eritrocito.

Volumen celular. Tamaño de la célula en tres dimensiones, determina la forma del eritrocito de acuerdo a la elasticidad de su membrana.

ABREVIACIONES

CRS	Células Rojas de la Sangre
EPO	Eritropoyetina
EPT	Extracto de Piel de Tejocote
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
g	gramo
GSH	Glutation reducido
L	Litro
LPO	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
mg	miligramo
µg	microgramo
NADH	Enzima Nicotinamina Adenín Dinucleótido Reducido
NADP	Enzima Nicotinamina Adenín Dinucleótido Fosfato
NADPH	Enzima Nicotinamina Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solución amortiguada de sales de fosfato)
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Gel de electroforesis de poliacrilamida)
ppm	Partes por millón
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados
Redox	Reacción de óxido-reducción
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE, gel de electroforesis de duodecil sulfato de sodio)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UATx	Universidad Autónoma de Tlaxcala
Bcl-X _L	Proteína antiapoptótica

XIII. ANEXOS

ANEXO I



INSTITUCIÓN: FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - ESCUELA DE NUTRICIÓN
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA DE LA NUTRICIÓN

INVESTIGACIÓN EN SUJETOS HUMANOS

SOLICITUD PARA: Revisión completa Revisión Autorización

Financiado por: Departamento Facultad Institución Otro CONACTE

Proyecto: Nuevo Renovación Continuación

Director del Proyecto/Investigación Principal: DR. DANIEL MÉNDEZ TURBIDE

Estudiante: M.O. JOSE ANTONIO BANDERAS TARABAY Escuela: NUTRICIÓN Teléfono: 246 4626908

Título del Proyecto: **VALORACIÓN DE EXTRACTOS DE TEJOCOTE (*Crotalaria mexicana*) EN LA INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN ERITROCITOS HUMANOS**

RIESGO MÍNIMO significa que la probabilidad o magnitud de daño o molestia anticipada en la investigación no son mayores que aquellas encontradas en la vida diaria o durante la realización de un análisis o examen de rutina.

RESPONSABILIDAD para proteger a los sujetos de estudio es responsabilidad de todo el equipo de investigación. El proyecto mencionado, el cual involucra el uso de sujetos humanos puede ser aprobado a través del proceso de revisión debido a que las actividades de investigación son de **RIESGO MÍNIMO**, siendo la participación de los sujetos de acuerdo a uno o más de los siguientes apartados:

- (1) Colección de: (a) cabello a uñas, sin desfigurarla ni apartarla (b) dientes deciduos (c) dientes permanentes si en el tratamiento del paciente es necesaria la extracción
- (2) Colección de secreciones excretadas externamente incluyendo sudor, saliva no canalicular, placenta, renovación durante el parto, fluido amniótico, flujo vaginal durante el rompimiento de la membrana.
- (3) Colección de datos de sujetos mayores de 18 años, utilizando procedimientos clínicos rutinarios no invasivos. No incluye la exposición a radiación electromagnética fuera del rango visible (rayos-X, micro-ondas).
- (4) Colección de muestras sanguíneas por venopuntura (sin exceder 450 ml/8 semanas, no más de 2 veces por semana) de sujeto mayor de 18 años, en buenas condiciones de salud, no embarazadas.
- (5) Colección de placa y calcúlos supra y subgingival, cuyo procedimiento no será más invasivo que una profilaxis dental y realizándose de acuerdo con las técnicas profilácticas de rutina.
- (6) Ejercicio moderado para voluntarios en buen estado de salud.
- (7) Análisis de datos existentes: documentos, expedientes de archivos, especímenes patológicos o de diagnósticos.
- (8) Investigación de drogas y aditivos en la cual no se requiere el eliminar otra droga o aditivo.
- (9) Cambios menores en una investigación previamente aprobada, durante el período que su autorización fue aprobada.

Sujetos humanos involucrados en las actividades del proyecto son:

Menores Joven Adulto Anciano Masculino Femenino Ninguno de los anteriores

Esto certifica que el proyecto será llevado a cabo con aprobación del Comité de Revisión en Sujetos Humanos y no será modificado ni se extenderá su duración más allá del período aprobado. La documentación será almacenada por un período de 3 años posterior a la finalización del estudio.

Director del Proyecto/Principal Investigador: _____ FECHA: 9-DE-2012 Director/Comité de Revisión: _____

ANEXO II

Tlaxcala, Tlax., a 8 de Febrero del 2012.

En la ciudad de San Pablo del Monte, Tlax., en las instalaciones de la Dirección de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Tlaxcala, se reunió el **Comité de Bioética de Nutrición** y el Dr. Daniel Méndez Turbide, responsable del C. de Nutrición, el día 9 de febrero del año en curso a las trece horas para la realización del proyecto de investigación titulado:

VALORACIÓN DE EXTRACTOS DE TEJOCOTE (*Crotalaria mexicana*) EN LA INHIBICIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN ERITROCITOS HUMANOS

El alumno responsable de dicho proyecto es el alumno de Doct. en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, M.O. José Antonio Banderas Tarabay, y como director de dicho proyecto el Dr. Daniel Méndez Turbide.

El comité de bioética determinó y autorizó que el proyecto de investigación no representa riesgo a la integridad física, mental o de salud de los sujetos y quienes participarán en el proyecto arriba referido.

No habiendo otro asunto que tratar, se da por terminada la reunión de la tarde del día 9 de febrero del 2012.

Damos fe los preceptos y quienes firmamos el presente acuerdo.

ATENTAMENTE

"Por la Cultura a la Justicia Social"

NOMBRE	FIRMA
Laura Angélica Martínez	
Roberto Vargas Gaudin	
Estela Gabriela Rodríguez	
Bernardo Estela Álvarez	

XIV. PUBLICACIONES Y CONGRESOS

