



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO COMO BIOMARCADOR
TEMPRANO DE TOXICIDAD EN PLASMA DE ENFERMERAS
OCUPACIONALMENTE EXPUESTAS Y NO EXPUESTAS A
MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS: ESTUDIO DE CASOS Y
CONTROLES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:
Q. F. B. GERARDO DANIEL MIRANDA MENDOZA

DIRIGIDO POR:

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ

DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO. SEPTIEMBRE 2014.



UAEM | Universidad Autónoma del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 069/2014

Toluca, México, 24 de enero de 2014

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
GERARDO DANIEL MIRANDA MENDOZA
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan
PRESIDENTE

FIRMA

Dr. Enrique Morales Avila
SECRETARIO

Dra. María Dolores Hernández Navarro
PRIMER VOCAL

Dra. Marcela Galar Martínez
SEGUNDO VOCAL

Dra. Sandra García Medina
TERCER VOCAL

Dra. Hariz Islas Flores
SUPLENTE

Dra. Edith Erielia Gutiérrez Segura
SUPLENTE

**ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía CLA-UAEM"**

M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA



c.c.p.Archivo

www.uaemex.mx

Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan • Toluca Estado de México
Tel. y Fax: 217-5109 y 217-3890 • fquim@uaemex.mx

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por siempre estar conmigo, por su infinita bondad y amor.

A MI HIJA, MIA YISZEL

Por tu presencia en mi mente y en mi vida, por ser mi infinita motivación y mi alegría.

A MIS PADRES, ESTHER Y JOSE LUIS

Por ser mis guías, por sus bendiciones infinitas y por su valiosa compañía.

Un peldaño más hacia nuestro el éxito.

A MI HERMANA, JANET

Por ser mí apoyo y por todos tus excelentes deseos.

¡Venga....vamos por más!

A MI ABUELITA, MAMÁ ONE

Por su ejemplo de constancia y fortaleza para lograr mi superación y mis éxitos, en especial por mantenerme presente en todas sus oraciones.

A MIS DIRECTORES DE TESIS, DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN DRA. PAULA ANEL CABRERA GALEANA

Por su apoyo, ejemplo y constante motivación.

Siempre van a ser mi modelo a seguir.

A MI HERMANO MAYOR, DR. RICARDO DAVID GALICIA SAMANO

Por su apoyo y filosofía, por su manera de ver y vivir la vida.

Por ser para mí, un ejemplo y un guía.

A MIS AMIGOS
ANGEL, HECTOR, ISRAEL, JOSE, JUAN CARLOS, LUIS Y OCTAVIO

Porque sin compartir la sangre, cada día se fortalece nuestra hermandad.

Por lo que ha sido y por lo que será.

**A TODOS Y CADA UNA DE LAS PERSONAS QUE HAN COMPARTIDO
CONMIGO SU AMOR, CARIÑO, AMISTAD, BENDICIONES E INCONDICIONAL
APOYO, A QUIENES SE HAN IDO Y A QUIENES ESTÁN.**

AL CONACyT Y COMECyT

Por el apoyo otorgado a través de los programas de becas de los que fui beneficiado.

INDICE

Contenido	Página
Índice de figuras.....	7

CAPITULO 1."Antecedentes"

1.1 Resumen.....	10
1.2 Abstract.....	11
1.3 Introducción.....	14
1.4 Marco conceptual.....	15
1.4.1 Cáncer.....	15
1.4.2 Medicamentos antineoplásicos.....	15
1.4.2.1 Clasificación de los medicamentos antineoplásicos.....	16
1.4.2.1.1 Alquilantes polifuncionales.....	16
1.4.2.1.2 Antimetabolitos.....	16
1.4.2.1.3 Alcoloides vegetales.....	17
1.4.2.1.4 Antibióticos.....	17
1.4.2.1.5 Antraciclinas.....	17
1.4.2.1.6 Agentes hormonales.....	19
1.4.3 Biomarcadores.....	19
1.4.3.1 Clasificación de biomarcadores.....	19
1.4.3.1.1 Biomarcadores de exposición o de dosis interna.....	19
1.4.3.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad.....	21
1.4.3.1.3 Biomarcadores de efecto (o respuesta).....	21
1.4.3.2 Estrés oxidativo.....	22
1.4.3.2.1 Radicales libres.....	22
1.4.3.2.2 Especies reactivas de oxígeno.....	23
1.4.3.2.3 Efectos del estrés oxidativo sobre biomoléculas.....	24
1.4.3.2.3.1 Lipoperoxidación.....	24
1.4.3.2.3.2.1 Etapas de la lipoperoxidación.....	24
1.4.3.2.3.2.2 Efectos de la lipoperoxidación.....	26
1.4.3.2.3.2 Daño a proteínas.....	26

1.4.3.2.3.3 Defensa antioxidante.....	26
1.4.3.2.3.3.1 Enzimas antioxidantes.....	27
1.4.3.2.3.3.1.1 Superóxido dismutasa.....	27
1.4.3.2.3.3.1.2 Catalasa.....	28
1.4.3.2.3.3.1.3 Glutati3n peroxidasa.....	28
1.4.3.3 Estr3s oxidativo en enfermeras ocupacionalmente expuestas.....	30
1.4.4 Los medicamentos citost3ticos y estr3s oxidativo.....	31
1.5 Justificaci3n.....	33
1.6 Hip3tesis.....	34
1.7 Objetivos.....	35
1.7.1 Objetivo general.....	35
1.7.2 Objetivos espec3ficos.....	35
1.8 Metodolog3a.....	36
1.8.1 Universo de estudio.....	36
1.8.2 Procedimiento.....	36
1.8.3 Criterios de inclusi3n.....	36
1.8.4 Criterios de exclusi3n.....	36
1.8.5 Evaluaci3n del estr3s oxidativo.....	37
1.8.5.1 Determinaci3n del grado de lipoperoxidaci3n.....	37
1.8.5.2 Determinaci3n de los niveles de oxidaci3n de prote3nas.....	37
1.8.5.3 Determinaci3n de la actividad de la s3per oxido dismutasa.....	38
1.8.5.4 Determinaci3n de la actividad de la catalasa.....	38
1.8.5.5 Determinaci3n de la glutati3n peroxidasa.....	39
1.9 An3lisis estad3stico.....	39
CAPITULO 2. "DISCUCI3N DE RESULTADOS"	
2.1 Resultados.....	41
2.1.1 Carta de recepci3n del art3culo.....	41
2.1.2 Art3culo.....	42
3. Conclusiones.....	68
4. Referentes bibliogr3ficos.....	68

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1.1 Doxorrubicina.....	18
Figura 1.2 Progresión de la acción de los biomarcadores de dosis interna al nivel molecular de dosis efectiva.....	20
Figura 1.3 Estrés oxidativo.....	22
Figura 1.4 Iniciación de la lipoperoxidación.....	25
Figura 1.5 Propagación de la lipoperoxidación.....	25
Figura 1.6 Tipos de antioxidantes.....	27
Figura 1.7 Reacción de Superóxido Dismutasa.....	27
Figura 1.8 Reacción de la Catalasa.....	28
Figura 1.9 Reacción de Glutación Peroxidasa.....	29
Figura 1.10 Reacciones de las enzimas antioxidantes.....	30
Figura 1.11 Preparación de medicamentos antineoplásicos.....	31
Figura 1.12 Ciclo celular y cáncer.....	32
Figure 1 LPX in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.....	59
Figure 2 PCC in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.....	60
Figure 3 SOD activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.....	61
Figure 4 CAT activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.....	62
Figure 5 GPx activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.....	63



CAPITULO 1."Antecedentes"

1.1 Resumen

Los medicamentos antineoplásicos empleados en el tratamiento de pacientes con cáncer; debido a sus mecanismos farmacodinámicos y a los procesos farmacocinéticos que experimentan, pueden generar radicales libres que provocan estrés oxidativo, tanto en los pacientes que son tratados con estos fármacos como en las personas que los manipulan (preparación y administración).

El personal de enfermería que se encarga de la preparación y la administración de los fármacos citotóxicos se encuentra expuesto a ellos y a los efectos que pueden causar en el organismo. La formación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y especies no radicalarias) que pueden unirse a las principales biomoléculas del organismo como los lípidos, proteínas y ADN, alterando la homeostasis del organismo, la cual ha sido relacionada con diversas manifestaciones patológicas, entre las que se puede mencionar: enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, padecimientos crónicos, inflamatorios, del tracto gastrointestinal, diabetes, envejecimiento de la piel, asma, necrosis tubular aguda, anemia hemolítica, isquemia, cataratas, aterosclerosis y enfermedades neoplásicas.

El presente trabajo evaluó el grado de estrés oxidativo en células sanguíneas de enfermeras ocupacionalmente expuestas y no expuestas a medicamentos antineoplásicos mediante los siguientes biomarcadores de estrés oxidativo: grado de lipoperoxidación (LPX), contenido de proteínas carboniladas (PCC), y la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).

Los resultados obtenidos de la población analizada de enfermeras expuestas y no expuestas a la preparación, manipulación y administración de medicamentos antineoplásicos son: Para el caso del personal de enfermería expuesto (n=15), 100 % fueron mujeres, con un promedio de edad de 32 años (rango de 25 a 35 años). Para el grupo control (n=15), 100% fueron mujeres, con un promedio de edad de 34 años (rango de 25 a 35 años).

Además, se observó que el grado de lipoperoxidación en enfermeras expuestas muestra un aumento significativo ($p \leq 0.05$) de 237.3% comparado con el grupo control; los niveles de proteínas carboniladas en enfermeras expuestas es de 173% mayor que en las enfermeras no expuestas ($p \leq 0.05$); La actividad de las enzimas antioxidantes es la siguiente; para SOD en expuestas de 149.5% comparado con las no expuestas; De CAT, en las enfermeras expuestas tiene un decremento de 25.5% en comparación con las no expuestas. Finalmente, en el caso

de GPx, para las enfermeras expuestas, el valor aumento en un 220.6% en contraste con el caso de el grupo control.

La información obtenida por el estudio permitió determinar que la valoración del estrés oxidativo puede considerarse como un biomarcador de toxicidad temprano en enfermeras ocupacionalmente expuestas a la preparación y administración de medicamentos antineoplásicos, comparados con enfermeras no ocupacionalmente expuestas. Así mismo, se realizó una contribución a la vigilancia epidemiológica para minimizar los daños potenciales a la salud del personal de enfermería en el área de quimioterapia y central de mezclas de los departamentos oncológicos dentro de cada hospital del estudio.

1.2 Abstract

Antineoplastic drugs are used in the treatment of cancer patients, because of their mechanisms pharmacodynamic and pharmacokinetic processes that experience can generate free radicals which cause oxidative stress, in patients treated with these drugs such as people handling these (preparation and administration).

The nursing staff is responsible for the preparation and administration of cytotoxic drugs, they are exposed to them and the effects that they can have on the body. The free radicals formation (both reactive oxygen and nitrogen) can join to the main body biomolecules such as lipids, proteins and DNA. They also alter the homeostasis of the organism that has been associated with various pathological conditions the neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Parkinson, -chronic diseases, inflammation of gastrointestinal tract, diabetes, aging skin, asthma, acute tubular necrosis, hemolytic anemia, ischemia, cataracts, atherosclerosis and neoplastic diseases.

This study aimed the degree of oxidative stress in blood cells from nurses always exposed and not exposed to antineoplastic drugs, through the following oxidative stress biomarkers: lipid peroxidation level (Buege and Aust, 1979), protein carbonyl content (Levine et al, 1994), and the activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (Misra and Fridovich, 1972), catalase (Radi et al, 1991) and glutathione peroxidase (Gunzler and Flohe, 1986).

The results of the population study (30 individuals) both exposed and unexposed nurses to

the preparation, handling and administration of anticancer drugs are: in the case of nurses exposed, 100% were women, with an average age of 32 years (range 25-35 years). For the control group, 100% were women, with an average age of 34 years (range 25-35 years). Furthermore, it was observed that the degree of lipid peroxidation in exposed nurses shows a significant increase ($p \leq 0.05$) of 237.3% compared with the control group; the levels of protein carbonyl content in exposed nurses was 173% higher than in unexposed nurses ($p \leq 0.05$). The activity of antioxidant enzymes was as follows: SOD exposed to 149.5% compared to the unexposed, CAT in exposed nurses have a decrease of 25.5% compared to the unexposed; Finally, GPx case for nurses exposed, the value in a 220.6% increase in contrast with the case of the control group.

Data obtained by the study determined that oxidative stress evaluation can be considered as a biomarker for early toxicity in nurses occupationally exposed to the preparation and administration of antineoplastic drugs, compared with nurses not occupationally exposed. In addition, an epidemiological surveillance was made to minimize potential damage to the health of nurses in the area of chemotherapy and mixtures central departments within each hospital oncology study.

1.3 Introducción

Las células de mamíferos producen energía a través de la respiración aeróbica mediante la reducción del oxígeno molecular a agua. Durante este proceso se forman especies reactivas de oxígeno (ERO): anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno; siendo este último no propiamente una ERO, sino una sustancia con alto poder oxidante. En situaciones de homeostasis estas moléculas intervienen en la regulación de la función celular, siendo la función antioxidante esencial para mantener el estado de equilibrio. Debido a que las ERO son biológicamente reactivas, tienen la posibilidad de interactuar con proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico. Cuando las ERO se producen en exceso pueden estar involucradas en diversos estados patológicos como daño por reperfusión, demencia y aterosclerosis.

El origen principal de las ERO en la vasculatura, esencialmente del superóxido, es el complejo enzimático de la nicotinamida dinucleótido fosfato -NADH/NADPH- que cataliza la reducción del oxígeno molecular usando NADPH como dador de electrones con la formación de superóxido. En neutrófilos activados, la enzima da lugar a la formación de grandes cantidades de anión superóxido y a otras ERO con fuerte actividad bactericida, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las oxidasas NADH/NADPH también funcionan en las membranas del endotelio vascular, de las células de músculo liso y de fibroblastos. La angiotensina II, trombina, factor de necrosis tumoral alfa y factor de crecimiento derivado de plaquetas son citoquinas y hormonas que aumentan la actividad de este complejo enzimático y, por ende, la producción de superóxido. La actividad de la NADH/NADPH oxidasa tiene un importante papel en la hipertensión inducida por angiotensina II. Aunado a esto, se sabe que los efectos acumulativos de los radicales libres están implicados en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, además de padecimientos crónicos, inflamatorios, del tracto gastrointestinal, diabetes, envejecimiento dérmico, asma, necrosis tubular aguda, arterosclerosis, anemia hemolítica, isquemia, cataratas, aterosclerosis y enfermedades neoplásicas.

Estudios referentes a enfermedades neoplásicas han reportado que el tratamiento con quimioterapia aumenta el estrés oxidativo y disminuye los niveles de vitamina C, vitamina E y glutatión peroxidasa en plasma.

De forma paradójica, el estrés oxidativo interfiere con el crecimiento del tumor ya que uno de los indicadores de este proceso, el incremento de lipoperóxidos, favorece la prolongación de un estado quiescente celular (fase G0). El problema es que los agentes

quimioterapéuticos o citostáticos actúan cuando las células malignas se están replicando de forma constante, no cuando se encuentran en un estado quiescente.

También ha sido reportado que las células tumorales poseen una mayor capacidad antioxidante que las células normales; sin embargo, este efecto es superado por el estrés oxidativo inducido por medicamentos citostáticos. Las células con un recambio mayor o de vida corta y que se regeneran constantemente son las más afectadas, empero, existen otros efectos indeseables relacionados con la generación de radicales libres, tal es el caso del efecto tóxico al corazón que induce la doxorubicina (taquicardia, insuficiencia cardiaca), la fibrosis pulmonar causada por la bleomicina y el efecto ototóxico del cisplatino.

Los agentes antineoplásicos producen estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad. En este proceso se generan radicales libres que al interaccionar con macromoléculas celulares afectan las funciones en el organismo. El resultado de esta situación, es la lipoperoxidación, oxidación de proteínas, la formación de aductos de ADN, mutaciones y alteraciones genéticas. Los procesos en cuyo daño se implican los radicales libres son muy variados, podemos citar la desnaturalización de las cadenas de ADN; la liberación de factores quimiotácticos que provocan la llegada de leucocitos activados, los cuales inducen la formación de radicales libres; el inicio de la peroxidación lipídica con alteración de la membrana celular que genera hidroperóxidos, aldehídos y endoperóxidos que dañan a las proteínas y al DNA; y la desnaturalización de proteínas citosólicas y enzimas de membrana.

En la actualidad, se maneja un número relativamente pequeño de fármacos antineoplásicos, por lo que se podría suponerse que el riesgo de cometer errores en su uso sería menor que en otras patologías. Sin embargo, este tipo de terapia entraña una gran complejidad. La preparación de citostáticos debe realizarse en una cabina de seguridad biológica cuyo diseño y funcionamiento garantice la protección del producto manipulado así como la del trabajador y del medio ambiente. En todos los casos debe procederse a capacitar a los trabajadores para que además de conocer el riesgo, lo minimicen con métodos de trabajo adecuados. La exposición del profesional a este tipo de fármacos no sólo depende del número de preparaciones por día que realice, sino también de la técnica personal de trabajo y precauciones que se tomen durante su manipulación. La inexistencia de una unidad centralizada de capacitación para la preparación y manejo de citostáticos, supone una menor protección frente sus efectos potencialmente tóxicos, además de una baja calidad asistencial a los pacientes.

Cabe mencionar que el cáncer ocupa una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, por tal motivo, gran cantidad de hospitales dan asistencia a pacientes con este

padecimiento, a pesar de, no todos ellos cuentan con equipo adecuado y personal capacitado para la preparación y manipulación de citostáticos.

Diversos síntomas y patologías han sido asociadas al manejo y preparación de citostáticos como son: leucemias, daño de la actividad reproductiva, abortos espontáneos, genotoxicidad, citotoxicidad, carcinogenicidad, además de daño del DNA de los linfocitos. Sin embargo, solo un estudio realizado en Brasil se enfocó a la investigación del estrés oxidativo y reportó que los niveles de catalasa estaban aumentados en sujetos ocupacionalmente expuestos a citostáticos y dichos niveles se incrementaban según transcurría su jornada laboral semanal. Actualmente, no hay más estudios reportados al respecto a pesar de su gran importancia y trascendencia.

1.4 Marco conceptual

1.4.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial donde se pierde el equilibrio entre proliferación y apoptosis, que se caracteriza por la destrucción del órgano que lo origina, invasión a órganos cercanos y metástasis en puntos distantes del organismo ya que las células pueden diseminarse en el cuerpo por el sistema linfático y sanguíneo (DeVita VT, 2010).

1.4.2 Medicamentos antineoplásicos

Por tres decenios se ha hecho un gran esfuerzo por desarrollar medicamentos antineoplásicos a través de pruebas de selección empíricas y síntesis racional de los nuevos compuestos. Los avances recientes en este campo han incluido la síntesis de péptidos y proteínas con la tecnología del ADN recombinante y de anticuerpos monoclonales.

Los fármacos anticancerosos idóneos podrían erradicar las células cancerosas sin poner en riesgo los tejidos normales, desafortunadamente, hoy en día no se dispone de agentes que reúnan estos criterios y el uso clínico requiere una evaluación de los beneficios frente a su toxicidad.

Las clases de medicamentos que recientemente se han estudiado incluyen los inductores de diferenciación, cuya intención es forzar a las células neoplásicas a pasar por una etapa de maduración para formar células en estado terminal con poco o ningún potencial proliferativo; antimetastásicos, diseñados para alterar las propiedades de superficie de las células malignas y modificar así su potencial invasivo y metastásico; agentes antiangiogénicos diseñados para

inhibir la formación de la vasculatura tumoral; agentes hipóxicos específicos de células madre, preparados para explotar la gran capacidad de reacciones reductivas en estas células terapéuticamente resistentes creadas por la deficiencia de oxígeno de los tumores sólidos; fármacos radiosensibilizantes tumorales y radioprotectores de tejido normal, dirigidos hacia una mayor efectividad terapéutica de la radioterapia, y modificadores de la respuesta biológica que alteran las relaciones metabólicas e inmunológicas tumor-huesped (Chabner BA, 2006; Hoppe R, 2010).

1.4.2.1. Clasificación de los medicamentos antineoplásicos

Los agentes antineoplásicos se pueden clasificar de la siguiente manera de acuerdo a su mecanismo de acción:

1.4.2.1.1. Alquilantes polifuncionales: ejercen efectos citotóxicos mediante la transferencia de grupos alquilo a diversos constituyentes celulares. Las alquilaciones de ADN dentro del núcleo probablemente representan las principales interacciones que conducen a la muerte celular. Sin embargo, estos fármacos también reaccionan con los grupos sulfhidrido, amino, hidroxilo, carboxilo y fosfato de todos los nucleófilos celulares. El mecanismo general de acción implica la ciclización intramolecular para formar un ion etilenoimonio que puede transferir directamente, o mediante la formación de un ion carbonio, un grupo alquilo a un constituyente celular. Además de la alquilación, un mecanismo secundario que se presenta con las nitrosoureas implica la carbamoxilación de los residuos de lisina de proteínas a través de la formación de isocianatos. El principal sitio de alquilación dentro del ADN es la posición N7 de la guanina. Sin embargo, de igual modo son alquiladas otras bases en menor grado, incluyendo N1 y N3 de la adenina, N3 de la citosina y O6 de la guanina, así como los átomos de fosfato y proteínas relacionadas con el ADN. Las células son más susceptibles a la alquilación en las fases G₁ tardía y S del ciclo celular y expresan bloqueo en G₂. Entre estos medicamentos encontramos a la ciclofosfamida, mecloretamina, melfalán y clorambucilo. El cisplatino y carboplatino se cree que actúan de manera similar a los agentes alquilantes, eliminan a las células en todas las etapas del ciclo celular, inhiben la biosíntesis de ADN por formación de entrecruzamientos intercadena, su sitio de fijación es el N7 de la guanina (Katzung B, et al, 2010).

1.4.2.1.2. Antimetabolitos (Análogos estructurales): las vías bioquímicas que han probado ser explotables con estos medicamentos han sido aquellas relacionadas con la síntesis

de nucleótidos y ácidos nucleicos. Algunos casos, cuando se sabe que una enzima tiene un importante efecto sobre las vías que llevan a la replicación celular, los inhibidores de la reacción que la catalizan han probado ser medicamentos útiles. El metotrexato es un antagonista del ácido fólico que se fija al sitio catalítico activo de la dihidrofolato reductasa (DHFR) interfiriendo con la síntesis de la forma reducida que acepta unidades de un carbono. La falta de este cofactor interrumpe la síntesis de timidilato, nucleótidos de purina, y los aminoácidos de serina y metionina, interrumpiendo así la formación de ADN, ARN y proteínas. Dentro de estos medicamentos se encuentran capecitabina, cladribina, citarabina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina y tioguanina (antagonista de la purina) (Chu E, DeVita VT, 2010).

1.4.2.1.3. Alcaloides vegetales: su mecanismo implica despolimerización de los microtúbulos, que son parte importante del citoesqueleto y del huso mitótico. Se fija específicamente a la proteína microtubular tubulina en forma dimérica; el complejo fármaco-tubulina se adhiere al extremo en formación de los microtubulos. Esto produce la detención del proceso mitótico en la metafase, la disolución del huso mitótico y la interferencia con la segregación de cromosomas. Dentro de este grupo se encuentra la vinblastina, vincristina, vinorelbine, etopósido, tenipósido, topotecan, irinotecan, paclitaxel y docetaxel (Katzung B, et al, 2010).

1.4.2.1.4. Antibióticos: el escrutinio de microbianos ha llevado al descubrimiento de una cantidad de inhibidores del desarrollo que han probado ser clínicamente útiles en la quimioterapia del cáncer. Muchos se fijan al ADN mediante la intercalación entre las bases específicas y el bloqueo de la síntesis de nuevo ARN o ADN (o ambos), producen la división de la cadena de ADN e interfieren con la replicación celular. Todos los antibióticos útiles de los que se dispone en la actualidad son productos de diversas cepas de microorganismos terrestres como *Streptomyces*. Estos incluyen las antraciclinas, actinomicina, bleomicina, mitomicina y plicamicina (Kufe D, 2006).

1.4.2.1.5. Antraciclinas: son la doxorrubicina y daunorrubicina, aislados de *Streptomyces peucetius* variante *caesius*, se encuentran entre los citotóxicos más útiles. Los dos representantes son aprobados por la FDA. Sus estructuras se muestran en seguida.

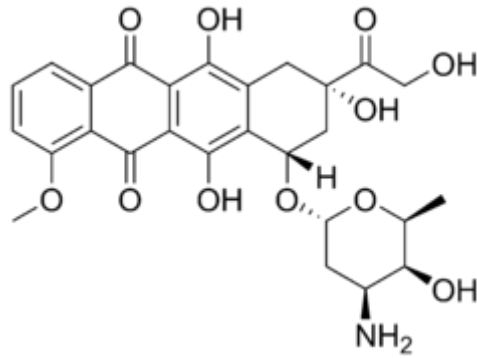


Figura 1.1 Doxorubicina.

Su mecanismo de acción es por medio de tres principales acciones para las toxicidades orgánicas y tumorales de las antraciclinas. Estas incluyen:

- 1) Fijación de alta afinidad al ADN a través de la intercalación con el bloqueo consecuente de la síntesis de ADN y ARN y la división de la cadena de ADN a través de efectos de la topoisomerasa II,
- 2) Fijación a las membranas para alterar la permeabilidad y el transporte de iones y _a.
- 3) Generación del radical libre semiquinona y de radicales de oxígeno a través de procesos reductivos mediados por enzimas. Esta última acción puede ser responsable de la toxicidad cardíaca a través del daño mediado por radicales de oxígeno a las membranas.

La doxorubicina es un antineoplásico muy importante, con mayor aplicación clínica en carcinomas de mama, endometrio, ovario, testículos, tiroides y pulmón; así como en el tratamiento de muchos otros sarcomas, incluyendo el neuroblastoma, sarcoma de Ewing, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma. De igual manera es útil en las patologías oncológicas hematológicas incluyendo leucemia aguda, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y los linfomas no Hodgkin. Es utilizado en el tratamiento adyuvante en el sarcoma osteogénico y el cáncer de mama.

El principal uso de la daunorrubicina es en el tratamiento de la leucemia aguda y para este propósito el fármaco puede tener una actividad ligeramente mayor que la doxorubicina. No obstante la daunorrubicina de hecho parece tener un espectro de utilidad más estrecho; su eficacia en tumores sólidos parece ser limitada (Katzung B, et al, 2010).

Las bleomicinas son una serie de antibióticos antineoplásicos producidos por *Streptomyces verticillus*. El material es clínicamente utilizado de 11 diferentes glucopéptidos siendo los principales componentes la bleomicina A₂ y la bleomicina B₂. Al parecer este fármaco actúa

mediante la fijación a ADN, que resulta en el rompimiento de la cadena sencilla y doble con la siguiente formación de radicales libres y la inhibición de la biosíntesis de ADN. La fragmentación del ADN se debe a la oxidación de un complejo ADN-bleomicina-Fe(II) que produce aberraciones cromosomales. La bleomicina produce acumulación en las células en fase G₂. Por otra parte, parece tener una interacción de sinergismo con otros medicamentos como la vinblastina y el cisplatino en el tratamiento de cáncer de testículo (Chu E, et al, 2010).

1.4.2.1.6. Agentes hormonales: los mecanismos de acción de las hormonas esteroides en los cánceres linfoides, mamario o prostático han sido parcialmente esclarecidos. Las hormonas esteroides se fijan a las proteínas receptoras en las células cancerosas, por lo que son predecibles altos valores de proteínas receptoras durante la respuesta al tratamiento endocrino. Se han identificado proteínas receptoras altamente específicas para los estrógenos, progesterona, corticosteroides y andrógenos en algunas células neoplásicas. Dentro de estos medicamentos están los inhibidores de estrógenos y andrógenos como son el tamoxifeno y flutamida; los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina como es el leuprolide y goserelina; y los inhibidores de aromatasa como son aminoglutetimida y anastrozol (Kantoff PW, 2001).

1.4.3. Biomarcadores

Se define como Biomarcador a los cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, asociado a la exposición a un tóxico, ya sean de naturaleza química, física o de otro tipo (Van der Oost *et al*, 2003). Se emplean para identificar la presencia y consecuencias biológicas de una exposición, la localización de los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, y detectar la sensibilidad de una población.

1.4.3.1 Clasificación de biomarcadores

1.4.3.1.1 Biomarcadores de exposición o de dosis interna

Es un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que se refleja tras la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina,

fundamentalmente) o incluso aire espirado (Repetto, 1997). En el caso de tóxicos acumulativos, la *dosis interna* refleja la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales.

Como se muestra en la figura 4, la progresión de la acción de los biomarcadores de dosis interna al nivel molecular de dosis efectiva, se valora por la exposición externa a cualquier compuesto o contaminante, lo cual genera una dosis interna en el organismo en estudio, dando con esto respuesta cuantificable mediante, la cantidad absorbida, la cantidad en tejido, células, macromoléculas y estado crítico ocasionado por el compuesto en cuestión (Christiani, 1996).

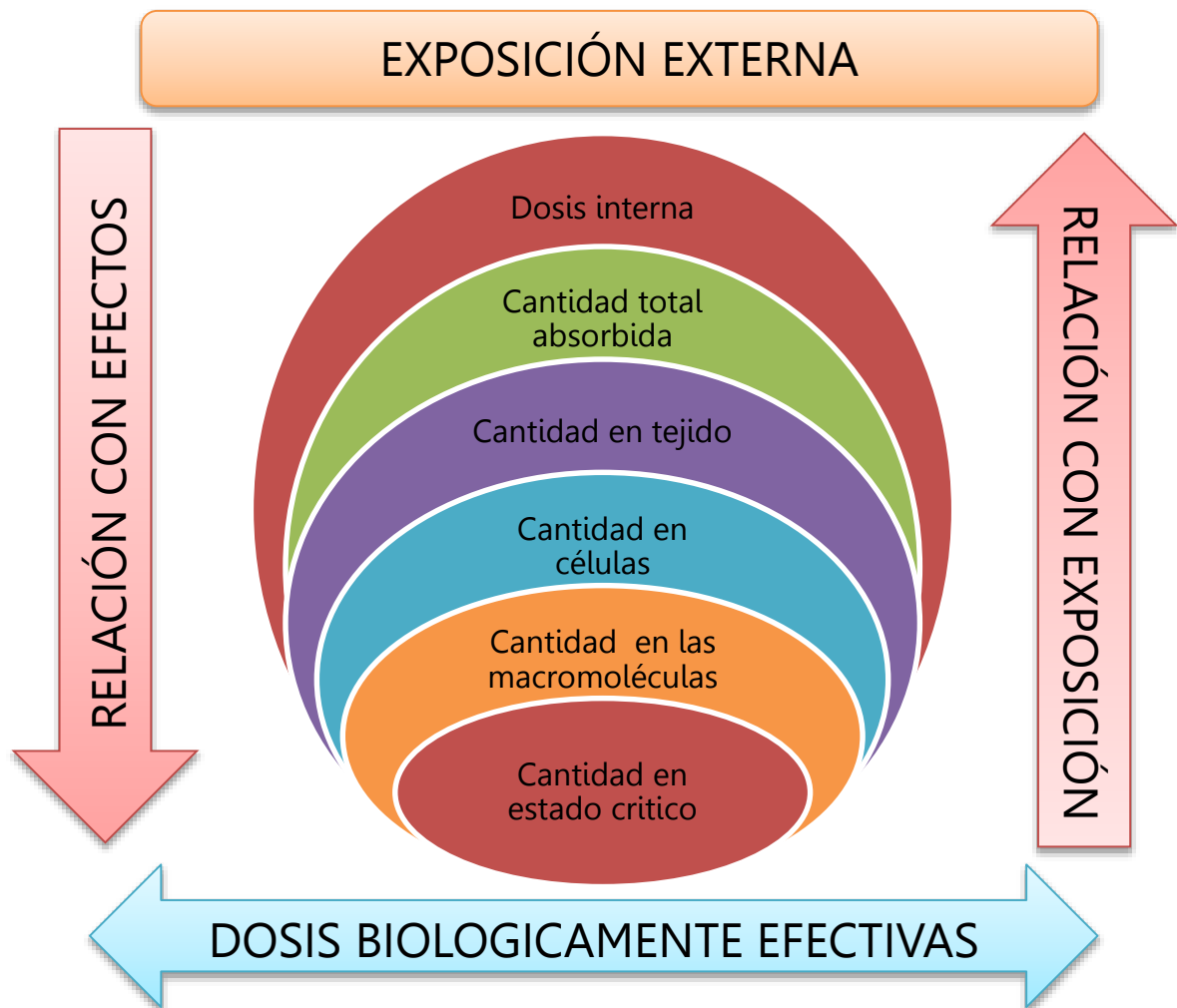


Figura 1.2. -Progresión de la acción de los biomarcadores de dosis interna al nivel molecular de dosis efectiva. FUENTE: Modificado de WHO, IPCS Environmental Health Criteria 155 Biomarkers and Risk Assessment Geneva, 1993.

Bernard y Lauwerys (2004), dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección: a) Los biomarcadores *selectivos* se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (plomo en sangre); b) Los *no selectivos* constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y carcinogénicas).

1.4.3.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad.

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción, clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997).

Siendo reportados los polimorfismos de sistemas activadores y polimorfismos de sistemas detoxificadores (Van Counteren *et al.*, 1996).

1.4.3.1.3 Biomarcadores de efecto (o respuesta)

Son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo y membrana) (Repetto, 1997).

Siendo importante resaltar a los biomarcadores de estrés oxidativo, debido a que algunos contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes) son capaces de originar daño oxidativo en el organismo, en respuesta a un mecanismo adaptativo, siendo desencadenados mecanismos adaptativos por los sistemas de protección, encontrando afectadas las moléculas de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Di Giulio *et al.*, 1989; Levine, 1994)

1.4.3.2 Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante (figura 6), que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte (Rodríguez *et al.*, 2001.).

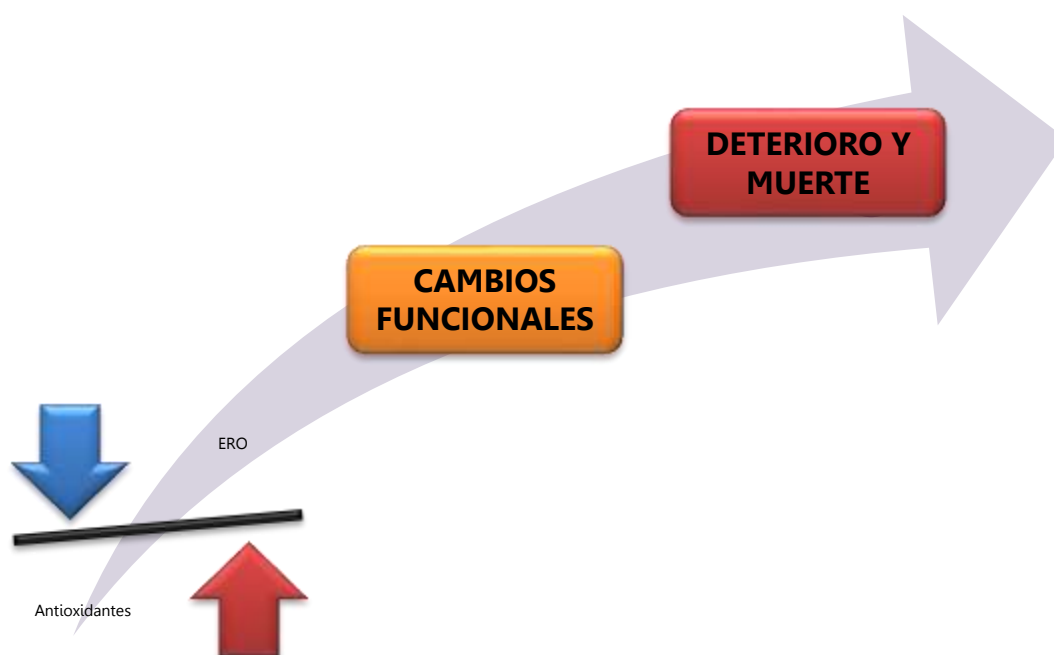


Figura 1.3. Estrés oxidativo

1.4.3.2.1 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una inestabilidad, alta reactividad y una gran capacidad de combinarse inespecíficamente con biomoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Son producidos continuamente como parte del metabolismo normal de la célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de captura). Durante el proceso metabólico una pequeña parte (2-3%) de los radicales libres pueden evadir el

mecanismo redox y causar daño oxidativo a los componentes celulares (Rodríguez *et al.*, 2001; Hangsber, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006).

1.4.4.2.2 Especies reactivas de oxígeno

Se consideran especies reactivas de oxígeno (ERO) al oxígeno atómico (O), al ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂, al superóxido (O₂⁻), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (·OH), estas últimas consideradas especies parcialmente reducidas. Las ERO en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y otros microorganismos, además de que son indispensables para diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El O₂ reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxiguanidina (Konigsberg, 2008).

El O₂⁻ es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula por que a partir de él se puede originar el ¹O₂ y el H₂O₂ (Valavanidis *et al.*, 2006; Konigsberg, 2008).

El H₂O₂ se forma cuando uno de los dos electrones de O₂ se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico ya que puede formar ¹O₂ y ·OH, aunado a la reacción con algunos metales de transición con los que se produce el radical ·OH el cual interacciona de forma irreversible con proteínas y DNA (Konigsberg, 2008).

El ·OH se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar tanto las bases púricas como las pirimídicas y también la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el DNA. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO dentro de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino oxidasa y citocromo P450 reductasa, que pueden producir O_2^- ; mientras que las enzimas guanidilciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes químicos son una fuente importante para la generación de ERO en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, los herbicidas, las quinolonas y los componentes nitroaromáticos, ampliamente conocidos por su potencial para causar estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

1.4.3.2.3 Efectos del estrés oxidativo sobre biomoléculas

1.4.3.2.3.1 Lipoperoxidación

Es la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que induce disfunción de los organelos, la cual puede culminar en daño ultraestructural. Las membranas celulares contienen fosfolípidos que contienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles, estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monosaturados, ya que los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (Hangsber, 2002).

La oxidación de los lípidos de membrana puede ocurrir tanto por la vía enzimática como por la no enzimática. Durante la no enzimática las ERO inician el daño oxidativo en los lípidos de membrana y los RL de los lípidos resultantes propagan el proceso de la peroxidación. En la lipoperoxidación enzimática los ácidos grasos oxidados son liberados por la fosfolipasa A2, el metabolismo de éste es una fuente de ERO que puede producir estrés oxidativo por tres vías: por la de la lipooxigenasa, que hace posible la formación de prostaglandinas; por la vía de la ciclooxigenasa que permite la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos y por la vía catalizada por el citocromo P450, que interviene en los procesos de detoxificación de diversas sustancias (Konigsberg, 2008).

1.4.3.2.3.1.1 Etapas de la lipoperoxidación

El proceso de la lipoperoxidación está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena, sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

a) Iniciación de la lipoperoxidación: comienza cuando un ácido graso poliinsaturados es atacado por una ERO que es capaz de absorber o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que no reacciona con el singulete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical peroxilo como se muestra en la figura 7.



Figura 1.4 Iniciación de la lipoperoxidación

b) Propagación de la lipoperoxidación: la molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, hará lo mismo a la molécula de ácido graso poliinsaturados adyacente (figura 8), estableciendo una reacción en cadena y de esta forma se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana.

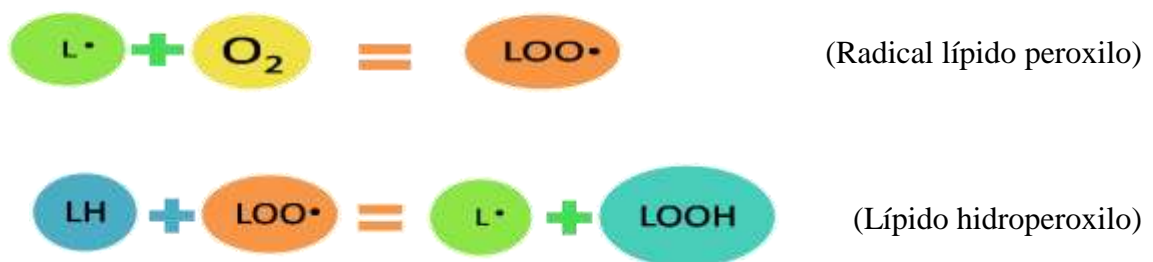


Figura 1.5 Propagación de la lipoperoxidación

c) Terminación: en el proceso de lipoperoxidación es el resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales por los radicales lipidoperoxilo. El resultante -LOOH que puede descomponerse fácilmente a varias especies reactivas, incluyendo radicales lípido-alcoxil ($\text{LO}\cdot$), aldehído (malondialdehído, alcanos, epoxi-lípidos y alcoholes (Valavanidis *et al.*, 2006).

1.4.3.2.3.1.2 Efectos de la lipoperoxidación

Cuando reaccionan los radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados entre sí se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o ciclación, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras moléculas (aminoácidos) y dañar a las células (Konigsberg, 2008).

1.4.3.2.3.2 Daño a proteínas

Diversas proteínas son capaces de tolerar una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. La oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológica. Por otro lado, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación de las proteínas es su carbonilación, la cual se puede llevar a cabo por la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treonina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación (Hangsber, 2002; Konigsberg, 2008).

1.4.3.2.3.3 Defensa antioxidante

Los organismos cuentan con diversos sistemas de defensa que les permiten contrarrestar los efectos del estrés oxidativo generado por RL y ERO. La defensa antioxidante puede subdividirse en antioxidante enzimáticos y en no enzimáticos (Figura 1.6) (Gregus y Klassen, 2001).

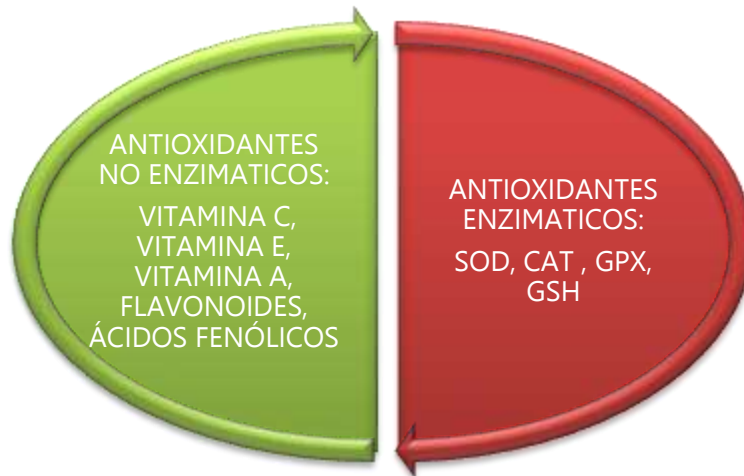


Figura 1.6. Tipos de antioxidantes

1.4.3.2.3.3.1 Enzimas antioxidantes

1.4.3.2.3.3.1.1 Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD), cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 y O_2 (figura 1.7). Esta familia de enzimas está formada por tres miembros: La SOD_1 que tiene en su centro catalítico Cu^{+2} y Zn^{+2} y se encuentra en el citoplasma y el núcleo; la SOD_2 que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y en su centro catalítico tiene Mn (III) y finalmente la SOD_3 se encuentra en el exterior de la célula y también tiene Cu^{+2} y Zn^{+2} en su centro catalítico (Hangsber, 2002; Konigsberg, 2008.).

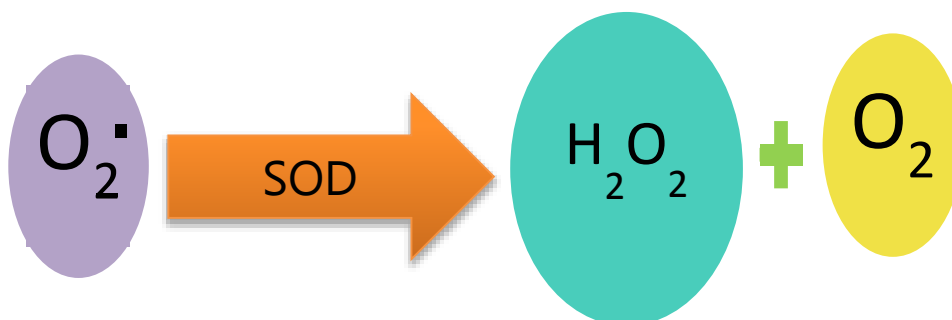


Figura 1.7. Reacción de Superóxido Dismutasa

1.4.3.2.3.3.1.2 Catalasa

Las catalasas (CAT) son enzimas capaces de descomponer el H_2O_2 a H_2O y O_2 (figura 1.8) a cualquier pH entre 4 y 11. Las monofuncionales tienen una sola actividad, pero existen otras que también son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas como metanol y etanol. Están formadas por cuatro subunidades asociadas a un grupo hemo cada una. Emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante, el H_2O_2 al entrar en el sitio activo de la enzima, toma un electrón del hierro y otro del hemo para generar una molécula de agua, una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de dióxígeno y otra de agua (Hangsber, 2002).

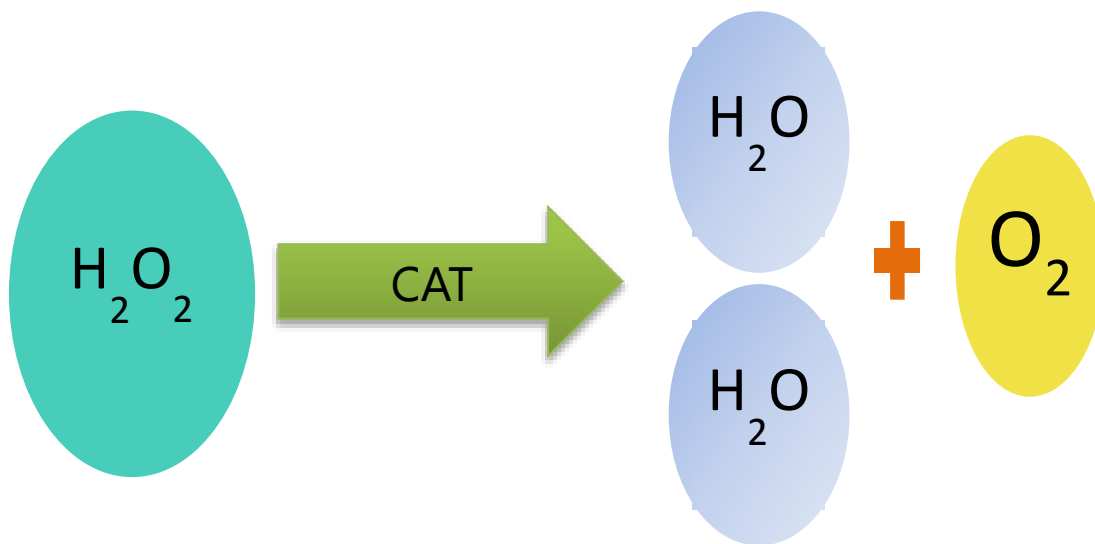


Figura 1.8 Reacción de la Catalasa

1.4.3.2.3.3.1.3 Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína, que requiere al glutatión como agente reductor del H_2O_2 (figura 1.9). Existen cuatro tipos de GPx, la citosólica (GPx₁), la gastrointestinal (GPx₂), la plasmática (GPx₃) y la de fosfolípidos (GPx₄). Son homotetrámeros, con la excepción de la GPx₄ que es un monómero de tamaño menor a las subunidades de las otras glutatión peróxidasas. La GPx de hidropéroxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los

hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol, son capaces de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos (Hangsber, 2002).

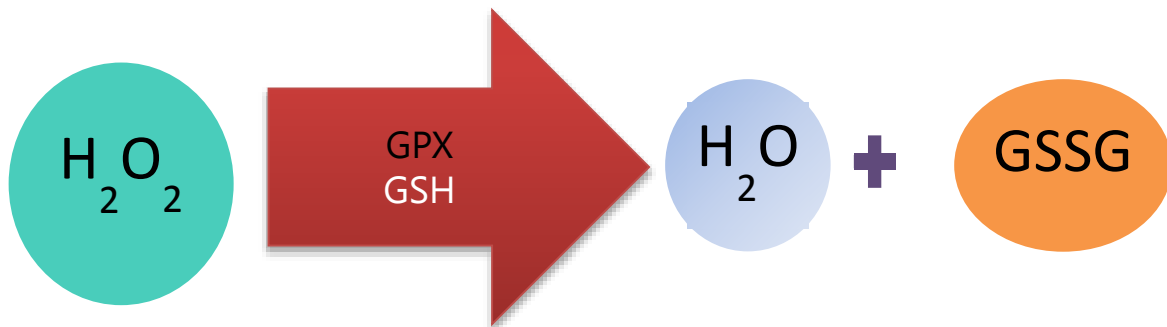


Figura 1.9 Reacción de Glutación Peroxidasa

En resumen, la figura 1.10 describe la reducción del oxígeno de electrón único que produce la formación de radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que se mantiene a concentraciones intracelulares bajas por medio de dismutación espontánea o rompimiento catalítico por la enzima SOD para forma peróxido de hidrógeno. Pueden ocurrir tres fenómenos con el peróxido de hidrógeno: en presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ o metales de transición, como el hierro o cobre, se reduce hacia el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$); puede catalizarse por la CAT para formar agua y oxígeno y puede detoxificarse mediante la GPx en presencia de glutación (GSH) para formar agua y glutación oxidado (GSSG) (Gregus y Klassen, 2001).

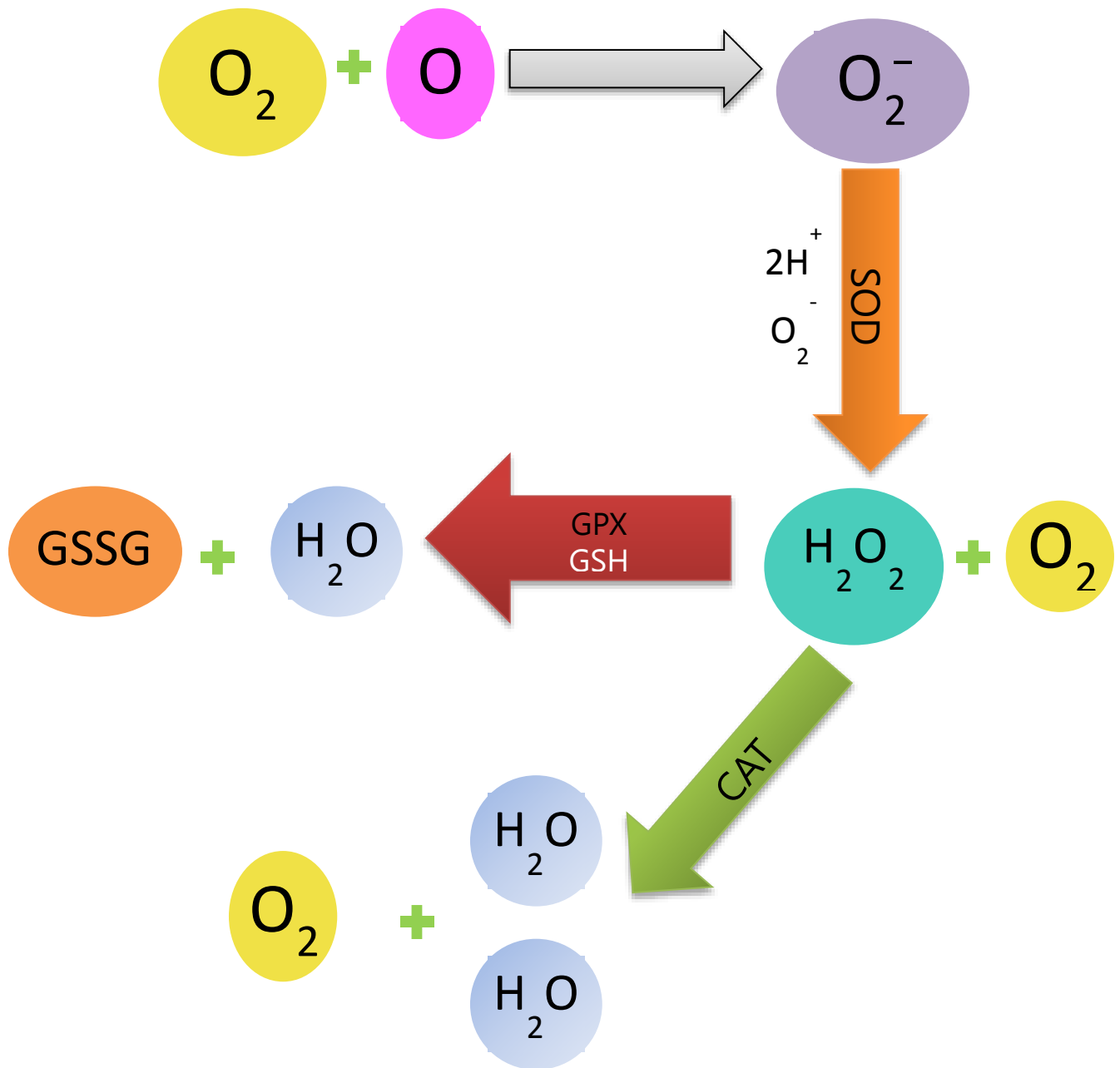


Figura 1.10 Reacciones de las enzimas antioxidantes.

1.4.3.3 Estrés oxidativo en enfermeras ocupacionalmente expuestas

El personal de enfermería encargado de manipular medicamentos citotóxicos debe ser informado acerca de todos los riesgos a los que se va a exponer para que tome una decisión

individual. Si el manejo, preparación (Figura 1.11) y administración de los medicamentos antineoplásicos se realiza con normas de seguridad adecuadas se reducirá el riesgo potencial por exposición.



Figura 1.11. Preparación de medicamentos antineoplásicos.

La preocupación por los riesgos laborales asociados con la manipulación de los agentes quimioterapéuticos aumenta día a día. Los citostáticos se manejan a menudo en condiciones inadecuadas con el riesgo de inhalación o contacto cutáneo. Las normas de seguridad deben cumplirse para evitar y minimizar los riesgos que conlleva la manipulación de estos medicamentos, estandarizar su preparación, administración y deposición final. Sin embargo no siempre se observan de manera adecuada estas normas y es cuando el personal de enfermería se encuentra expuesto a los efectos que estos agentes producen.

1.4.4 Los medicamentos citostáticos y estrés oxidativo

El balance de las especies oxidantes y antioxidantes, puede ser un factor clave para aumentar los efectos de los agentes antineoplásicos, así como también para prevenir ciertos efectos secundarios de la quimioterapia (Andreadou I, et al, 2007).

Durante el tratamiento con quimioterapia el estrés oxidativo aumenta de forma muy marcada, y los niveles de vitamina C, vitamina E y glutatión disminuyen considerablemente en el plasma (Gao S, et al, 2008).

De forma paradójica el estrés oxidativo interfiere con el crecimiento del tumor. Uno de los indicadores de este proceso, los lipoperóxidos, al incrementarse conllevan a una prolongación de las células a un estado quiescente (fase G1 o G0 (Figura 1.12)), y los agentes quimioterapéuticos actúan cuando las células malignas se están replicando de forma constante, no cuando se encuentran en un estado quiescente.

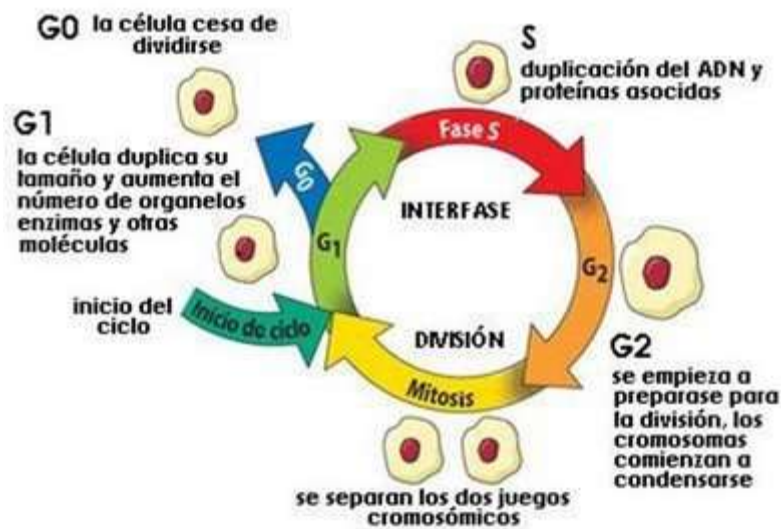


Figura 1.12 Ciclo celular y cáncer.

Las células malignas poseen una capacidad antioxidante mayor que las células normales; sin embargo, este efecto es superado por el estrés oxidativo inducido por medicamentos antineoplásicos, las células cancerosas en estado quiescente (fase G0) no son afectadas por éstos. Los radicales libres interfieren directamente con los efectos citotóxicos, es decir con su actividad antineoplásica (Katzung B, et al, 2010).

El uso de medicamentos antineoplásicos conlleva a una serie de efectos secundarios. Algunos son esperados e indicativos de una respuesta adecuada. Tal es el caso de la supresión de la médula ósea; la mielosupresión. Las células con un recambio mayor, es decir aquellas con vida corta y que se regeneran constantemente son las más afectadas. Empero, existen otros efectos indeseables que no necesariamente indican que el medicamento está llevando a cabo su función. El efecto tóxico al corazón de la doxorubicina (taquicardia, insuficiencia cardiaca), la fibrosis pulmonar causada por la bleomicina y el efecto ototóxico del cisplatino tiene que ver, en mayor o menor grado, con la generación de radicales libres. La generación de radicales libres durante la quimioterapia juegan un rol significativo en el desarrollo de cáncer secundario, aparición de otro cáncer en años posteriores a la quimioterapia (DeVita, et al, 2010).

Los agentes antineoplásicos pueden producir estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad. En este proceso se generan radicales libres que al interactuar con las macromoléculas celulares afectan las funciones en el organismo. El resultado de esta situación, es la lipoperoxidación, oxidación de proteínas, la formación de aductos de ADN, mutaciones y alteraciones genéticas. Los procesos en cuyo daño se implican los radicales libres son de especie muy variada; no obstante pueden citarse algunas alteraciones como son:

desnaturalización de las cadenas de ADN, liberación de factores quimiotácticos que provocan la llegada de leucocitos activados que a su vez generan más de estos radicales, inicio de la peroxidación lipídica con alteración de la membrana celular, que genera hidroperóxidos, aldehídos y endoperóxidos que dañan a las proteínas y al DNA; y la desnaturalización de proteínas presentes en el citosol y las enzimas de membrana (Sohal R, 2002; Singh U, 2006).

1.5 Justificación

La manipulación de antineoplásicos (citostáticos) es una actividad con un riesgo potencial asociado a estos medicamentos. Todas las operaciones de preparación de éstos deben realizarse en una cabina de seguridad biológica cuyo diseño y funcionamiento garantice suficientemente tanto la protección del producto manipulado como la del trabajador, sumándose a esta necesidad la protección del medio ambiente laboral y comunitario. En todos los casos debe procederse a una formación de los trabajadores para que además de conocer el riesgo, los minimicen con métodos de trabajo adecuados.

La exposición del profesional a este tipo de fármacos no sólo depende del número de preparaciones por día que se realicen sino, y, sobre todo, de la técnica personal de trabajo y de las precauciones que se tomen durante su manipulación (Valanis V, et al, 1999).

La inexistencia de una unidad centralizada de capacitación para la preparación y manejo de citostáticos supone una menor protección frente a sus efectos potencialmente tóxicos, como para disminuir la calidad asistencial de los pacientes.

Se sabe que los agentes quimioterapéuticos pueden producir estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad. En este proceso se generan radicales libres que al interaccionar con los lípidos estructurales de las membranas celulares producen lipoperoxidación. El resultado de esta situación, es la formación de aductos de ADN, mutaciones y alteraciones genéticas. Así, los efectos acumulativos de los radicales libres están implicados en mecanismos de producción de diferentes condiciones patológicas en humanos (Singh U, et al, 2006; Andreadou I, et al, 2007; Gao S, et al, 2008).

Por lo anterior se hace necesario contar con biomarcadores tempranos eficaces, seguros, confiables, rápidos, sensibles y asequibles, que puedan ser utilizados para apoyar a la vigilancia epidemiológica para la prevención de los daños potenciales a la salud en los trabajadores expuestos a estos medicamentos. El contar con estas herramientas permite: 1) Proporcionar la máxima seguridad al personal sanitario frente a la exposición de citostáticos, 2) Aumentar la calidad asistencial de los pacientes, verificando que se cumpla con las normas de preparación

de estos medicamentos por el personal de enfermería, 3) Permitir optimizar los recursos: minimización de la contaminación y de los recursos materiales empleados y 4) Aportar beneficios adicionales como asegurar la estabilidad y la esterilidad de los citostáticos preparados.

1.6 Hipótesis

Si las enfermeras ocupacionalmente expuestas a la preparación y administración de medicamentos antineoplásicos no observan las medidas necesarias para estas actividades entonces se incrementará el grado de estrés oxidativo aumentándose el indicador a nivel proteínas carboniladas y grado de lipoperoxidación, además en la defensa antioxidante por las enzimas SOD, CAT y GPX se observarán variaciones significativas.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Evaluar el estrés oxidativo generado en enfermeras ocupacionalmente expuestas y no expuestas a medicamentos citotóxicos, como biomarcador temprano de toxicidad.

1.7.2 Objetivos Específicos

- O1.** Determinar el grado de lipoperoxidación así como los contenidos de proteínas carboniladas en plasma de personal ocupacionalmente expuesto y no expuesto a medicamentos citostáticos.

- O2.** Determinar los niveles de enzimas antioxidantes (glutación peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa) en plasma de personal ocupacionalmente expuesto y no expuesto a medicamentos citostáticos.

- O3.** Establecer la relación de los biomarcadores de estrés oxidativo analizados en personal ocupacionalmente expuesto y no expuesto a medicamentos citostáticos.

1.7 Metodología

Tipo de Estudio: observacional

Diseño del Estudio: descriptivo, correlacional, prospectivo.

1.8.1 Universo de estudio

El estudio se llevará a cabo en enfermeras ocupacionalmente expuestas y no expuestas a medicamentos citotóxicos que laboran en el Centro Oncológico Estatal ISSEMyM de la Ciudad de Toluca en el Estado de México, Hospital Materno Infantil del ISSEMyM, en la Clínica 220 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de Toluca en el Estado de México, En la Unidad de Medicina Familiar No. 231 del IMSS, en Metepec, Estado de México y en el Hospital para el Niño DIF, en Toluca, Estado de México.

1.8.2 Procedimiento

La selección de la muestra no es probabilística, de oportunidad, secuencial y de grupos intactos. El tamaño de muestra es de 30 enfermeras para cada grupo, pues se considerarán todas las enfermeras ocupacionalmente expuestas y no expuestas a medicamentos antineoplásicos bajo previo consentimiento informado. A las enfermeras se les invitó a participar en el proyecto, se les informo de las características del estudio y la necesidad de tomarles una muestra de sangre, aquellas que acepten firmaron una carta de consentimiento informado. Se les tomarán dos muestras de sangre venosa utilizando heparina y EDTA como anticoagulante, las cuales se transportarán bajo condiciones apropiadas al laboratorio de Toxicología en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex) para su análisis.

1.8.3 Criterios de inclusión

- Antigüedad laboral mayor de 2 años.
- Intervalo de edad de 18 a 35 años.
- Que manifiesten estar sanos.

1.8.4 Criterios de exclusión

- Que cursen con enfermedades crónicas degenerativas.
- Fumadoras y alcohólicas.
- Que hayan tenido tratamientos radiológicos.

1.8.5 Evaluación del estrés oxidativo

Para evaluar el grado de estrés oxidativo se utilizaron los siguientes biomarcadores: lipoperoxidación que se determinó por la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído formado por la peroxidación de los lípidos de las células (Buege J, et al, 1978), la oxidación de proteínas por el método de Levine (Levine RL, et al, 1994), la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (Aebi H, 1984) y la catalasa siguiendo los métodos modificados de Misra HP, Fridovich I (1972) y Radi R (1991), respectivamente, así como la glutatión peroxidasa (Gunzler y Flohe), se cuantifico la cantidad de proteína total por lo método de Bradford (1976).

1.8.5.1 Determinación del grado de lipoperoxidación

A 500 μ L del homogenizado celular (sin centrifugar) se adicionaron 1 mL de la solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4. Se incubará a 37°C por 30 minutos. Después de la incubación se agregó 2 mL de la solución de ácido tiobarbitúrico al 0.375% (preparada al momento) en ácido tricloroacético al 15% y se incubo a 37°C por 45 minutos. Concluido el tiempo se centrifugo a 2500 rpm por 5 minutos y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresan en mM de malondialdehído /mg proteínas/g tejido usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Beuge J, et al, 1978).

1.8.5.2 Determinación de los niveles de oxidación de proteínas

A 100 μ L de sobrenadante se le adicionarón 150 μ L de 10mM de DNPH/2M HCl. Se incubo durante 1 h a oscuridad. Después de la incubación se le adicionarón 500 μ L de tricloroacético al 20% y se dejó reposar durante 15 minutos a 4° C. El precipitado se centrifugo a 11,000 rpm durante 5 minutos. El botón se lavó dos veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubo a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresan en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) /mg proteínas, se utiliza el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de $21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levine RL, et al, 1994).

1.8.5.3 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

Se adicionaron 20 μL del homogenizado celular a la celda y se completa a 150 μL con la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Se agregaron 100 μL de adrenalina 30 mM, y se determino la absorbancia a 480 nm, a los 30 segundos y 5 minutos (Aebi H, 1984; Misra HP, et al, 1972). Las lecturas de las muestras se extrapolaron en la curva tipo que se obtiene utilizando los datos de la siguiente tabla.

Curva tipo para la determinación de la SOD.

Unidades SOD	SOD (μl)*	Adrenalina (μl)**	Buffer de Carbonatos (μl)***
18.65	5	100	145
37.3	10	100	140
55.95	15	100	135
74.6	20	100	130
93.25	25	100	125

*De una solución de 375 U SOD. ** De una solución de 30 mM adrenalina. ***De una solución de 50 mM de NaCO_3 , 0.1 mM EDTA, pH 10.2.

1.8.5.4 Determinación de la actividad de la catalasa

A 20 μL del sobrenadante del homogenizado celular se le agrego 1 mL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 0.2 mL de la solución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se determino la absorbancia a 240 nm, a 0 y 60 segundos (Radi R, et al, 1991). Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de ambos tiempos en la siguiente formula:

$$\text{Concentración de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.093 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos son expresados en mM de H_2O_2 /min/g tejido.

1.8.5.5 Determinación de glutatión peroxidasa (Paglia DE, et al, 1967) con modificaciones

Se tomó 0.1 mL de sobrenadante (fracción S9 obtenido por centrifugación diferencial) en una celda de cuarzo de 1.0 cm y se agregó 1.0 mL de sol buffer (50 mM de fosfato de potasio pH 7.0; 3.5 mM de GSH, 1.0 mM de NaN_3 , 2 U de glutatión reductasa, y 0.12 mM NADPH / 1.0 ml), posteriormente se mezcló. Se agregaron 0.1 mL de H_2O_2 y se registraron las lecturas inicial y a los 5 minutos. Para calcular la actividad de la GPX por minuto se utilizó del coeficiente de extinción molar del NADPH de $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.9 Análisis estadístico

Se construyó una base de datos en donde se agrupó a la población ocupacionalmente expuesta y no expuesta, se realizó un análisis estadístico descriptivo y posteriormente un análisis multivariado para conocer el grado de asociación entre las variables estudiadas y el nivel de estrés oxidativo empleando el programa estadístico SPSS versión 11 para windows. Así mismo se determinó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los biomarcadores empleados.

CAPITULO 2. "DISCUSIÓN DE RESULTADOS"

2.1 Resultados

2.1.1. Carta de recepción del artículo.

Environment International <r.alcock@lancaster.ac.uk> 9 de octubre de 2013 15:48 Para: Leobardo Manuel Gomez Olivan <lmgomezo@uaemex.mx>, "lgolivan74@gmail.com" <lgolivan74@gmail.com> Submission Confirmation

Dear Leobardo,

Your submission entitled "Oxidative stress induced in nurses by exposure to preparation and handling of antineoplastic drugs in Mexican hospitals: a multicentric study" has been received by Environment International

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/envint/>.

Your username is: lmgomezo@uaemex.mx If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/envint/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Thank you for submitting your work to this journal. Kind regards,

Elsevier Editorial System Environment International

2.1.2 Artículo: **Oxidative stress induced in nurses by exposure to preparation and handling of antineoplastic drugs in Mexican hospitals: a multicentric study**

Gerardo Daniel Miranda-Mendoza¹, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{1*}, Paula Anel Cabrera-Galeana², Marcela Galar-Martínez³, Hariz Islas-Flores¹, Jorge J Ramírez-García¹, Enrique Morales-Ávila¹, Nadia Neri-Cruz¹, Sandra García-Medina³

¹Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México, México.

²Centro Oncológico Estatal del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios. Toluca, México, México.

³Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México, DF, México.

*CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván

Laboratorio de Toxicología Ambiental. Departamento de Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, s/n. Col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México, C.P. 50120 México

Tel + (52) 7222173890

Fax + (52) 7222173890

E-mail address: lmgomezo@uaemex.mx (L.M. Gómez-Oliván)

leobardo_gomez_olivan@yahoo.com.mx

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate oxidative stress in nurses occupationally exposed to the preparation and handling of antineoplastic drugs in diverse hospitals in Mexico. Lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC) and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were evaluated in blood of study participants. The group of occupationally exposed (OE) nurses consisted of 30 individuals ranging in age from 25 to 35 years. The control group included 30 nurses who were not occupationally exposed to the preparation and handling of antineoplastic drugs and whose sociodemographic characteristics were similar to those of the OE group. All biomarkers evaluated were significantly increased ($p < 0.5$) in OE nurses compared to the control group. Results show that the assessment of oxidative stress biomarkers is advisable in order to evaluate exposure to antineoplastic drugs in nurses.

Keywords: oxidative stress, nurse, antineoplastic drugs, biomarkers

1. INTRODUCTION

Antineoplastic drugs have been reported to induce oxidative stress as a mechanism of toxicity. Free radicals (FRs) formed during this process interact with macromolecules to induce lipid peroxidation (LPX), as well as oxidation of proteins and of puric and pyrimidine bases of DNA. However, there is a group of antioxidant enzymes such as

superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) which inhibit oxyradical formation, thus aiding in the process of detoxification of these substances in the body (Singh and Jialal 2006; Sohal 2002).

An increase in the levels of FRs has a long-term impact on formation of DNA adducts, mutations and genetic alterations. Thus, the cumulative effects of FRs are involved in the mechanisms of production of diverse pathologies including neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, as well as chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, diabetes, aging of the skin, asthma, acute tubular necrosis, arteriosclerosis, hemolytic anemia, ischemia, cataracts, and neoplastic diseases (Ferri et al. 2008; Krzystek-Korpacka et al. 2008; Abdilla et al. 2007; Millar et al. 2007; Seal and Gewertz 2005).

At present, only a relatively small number of antineoplastic drugs are used. It might therefore be assumed that there is a lower risk of mistakes being made during their preparation and handling than with other pathologies. However, this type of therapy is highly complex. Antineoplastic drugs should be prepared in a biological safety cabinet designed and operated to ensure protection of the product being handled as well as of nurses and the environment. In all cases, health care workers should receive formal training so that, besides being aware of the risk involved, they can minimize it with appropriate work methods. Exposure of health professionals to this type of pharmaceuticals depends not only on the number of preparations performed each day, but also on individual work procedures as well as the precautions taken in handling these agents. The lack of a centralized unit for formal training in the preparation and handling of antineoplastic

medications implies a lower level of protection against the potential toxicity of these agents.

Diverse pathologies have been reported in nurses and pharmacy personnel who handle and prepare antineoplastic drugs, among others, leukemia, impaired reproductive activity, spontaneous abortion, genotoxicity, cytotoxicity, carcinogenicity, and lymphocyte DNA damage (Marczak and Józwiak 2009; Rombaldi et al. 2009; Gan et al. 2008; Zhang et al. 2008; Ryhak et al. 2007; Scheibmeir et al. 2005; Turci et al. 2002; Mucci et al. 2000; Valanis et al. 1999; Fuchs et al. 1995; McDiarmid and Egan 1988).

It is important to mention that health professionals in Mexico in charge of preparing and handling antineoplastic drugs do not for the most part receive formal training nor are they provided special areas equipped for handling these agents. Therefore, the goal of this study was to evaluate oxidative stress in nurses occupationally exposed (OE) to the preparation and handling of antineoplastic drugs in different hospitals in Mexico, and to determine if occupational exposure is a potentially reliable early warning biomarker for toxicity assessment in these health care professionals.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Study population

The research protocol used complies with ethical principles in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics in Research Committee of the Centro Oncológico Estatal ISSEMyM , the hospital where the project for the present study was submitted for

evaluation and to which nurses from the various hospitals and clinics participating in the study were directed.

A multicentric study was carried out on nurses occupationally exposed to preparation and handling of antineoplastic drugs and nurses unexposed to these conditions, who work in different hospitals in the State of Mexico including the Centro Oncológico Estatal ISSEMyM, DIF Children's Hospital, Clinic 220 of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), and ISSEMyM Mother and Child Hospital in the city of Toluca, as well as the IMSS Family Medicine Unit 231 in Metepec.

Sampling was non-probabilistic, opportunistic, sequential and by intact groups. The sample size for each group was 30 individuals, taking into account nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation and handling and nurses unexposed to these conditions for a total study population of 60 nurses.

Nurses evaluated were invited to participate in the study. They were informed of the characteristics of the study and of the need to take a blood sample from each. Individuals agreeing to take part in the study signed an informed consent letter and answered a questionnaire on their lifestyle (age, place of residence, birthplace, sleep and rest habits, diet, and physical activities) and employment history (years in an antineoplastic drug preparation-related job, and use of protective equipment).

2.2 Study groups

Based on questionnaire responses, study participants were divided into two groups: occupationally exposed (OE) and unexposed or control.

Nurses in the OE group were selected according to the following criteria: more than two years in an antineoplastic drug preparation-related job and 25 to 35 years in age.

Individuals receiving medical treatment or who had chronic degenerative disease (cardiovascular disease, hypertension, diabetes), were smokers or alcoholics, or were receiving radiation treatment or chemotherapy were excluded from the study.

The control group was formed by nurses who did not come into contact with antineoplastic agents, were similar in socioeconomic characteristics and age to OE participants, and whose work activity did not involve the preparation or handling of antineoplastic drugs. These volunteers were initially contacted at the Centro Oncológico Estatal ISSEMyM.

2.3 Sampling

Blood samples taken from study participants following a 12-h fast were obtained in two collection tubes: one containing heparin as an anticoagulant and the other with EDTA for use in hemoglobin determination. Samples were placed in an ice bath for transport to the laboratory and immediate analysis. The following biomarkers were evaluated: LPX, protein carbonyl content (PCC) in order to evaluate oxidized protein content, and activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx. Hemoglobin levels and total protein content were used to express results.

2.4 Determination of oxidative stress status

2.4.1 Determination of LPX

LPX was determined by the Büege and Aust (1978) method which is based on quantification of malondialdehyde (MDA), the end product of lipid peroxidation. To 500 μL blood was added Tris-HCl buffer pH 7.4 to attain a 1-mL volume, plus 2 mL TCA-TBA reagent [15% trichloroacetic acid and 0.375% thiobarbituric acid (w/v)]. The sample was heated to boiling for 45 min, allowed to cool and the precipitate removed by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. Absorbance was read at 535 nm against a reagent blank. Results were expressed as mmol MDA/g hemoglobin, and determination was made using a molar extinction coefficient (MEC) of 1.56×10^5 /mol/cm.

2.4.2 Determination of PCC

PCC was determined using the Levine et al. method (1994). Soluble proteins were obtained by centrifugation of samples at 10,500 rpm for 30 min. To 100 μL of this supernatant was added 150 μL of 10 mM dinitrophenylhydrazine in 2 M HCl (Sigma), prior to incubation at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 μL of 20% TCA was added and the sample was allowed to rest for 15 min at 4 °C. It was then centrifuged at 16,000 rpm for 5 min. The bud was rinsed three times in 1:1 ethanol:ethyl acetate (Baker), dissolved in 150 μL of 6 M guanidine (Sigma) pH 2.3, and incubated at 37 °C for 30 min. Absorbance was read at 366 nm and results were expressed as nmol of protein carbonyls (C=O) formed/g hemoglobin based on the MEC of 21000/M/cm for these chemical groups.

2.4.3 Determination of SOD activity

SOD activity was determined by the modified Misra and Fridovich method (1972) which is based on inhibition of adrenaline autoxidation at pH 10.2 in erythrocyte lysates free of hemoglobin and other proteins. In a quartz cuvette were placed 150- μ L aliquots of homogenate (obtained from 500 μ L total blood in 2 mL distilled water, sonicated for 15 min, then supplemented with 2.5 mL of 1:1 ethanol:chloroform). Addition was then made of 750 μ L of carbonate buffer solution pH 10.2 (50 mM sodium bicarbonate, 0.1 mM EDTA, adjusted to pH 10.2 with Na_2CO_3 in powdered form) and 600 μ L adrenaline (30 mM) in 0.05% acetic acid. Absorbance was read at 0 s, 30 s and 5 min, at 480 nm. Results were expressed as μ mol SOD/g hemoglobin. Estimates were derived by the formula $[\text{SOD}] = (A_{30s} - A_{5min}) * (A_0/\text{MEC})$, where the MEC of adrenaline is 21/M/cm.

2.4.4 Determination of CAT activity

CAT activity was quantified by the Radi et al. method (1991), which is based on disappearance of H_2O_2 as a result of CAT action through change in absorbance per minute. To 20 μ L erythrocyte homogenate plus 1 mL of isolation buffer solution (0.3 M sucrose; 1 mM HEPES; 5 mM KH_2PO_4 adjusted to pH 7.4) was added 200 μ L H_2O_2 (20 mM), reading absorbance at 0 and 60 s, at 240 nm in quartz cuvettes. Results were expressed as μ mol H_2O_2 /mg hemoglobin. Estimates were obtained using the formula $[\text{H}_2\text{O}_2] = (A_{0s} - A_{60s})/\text{MEC}$, where the MEC of H_2O_2 is 0.043/mM/cm.

2.4.5 Determination of GPx activity

GPx activity was determined by the Gunzler and Flohe-Clairborne method (1985). To 100 μ L of supernatant was added 10 μ L glutathione reductase (2 U glutathione reductase, Sigma-Aldrich) plus 290 μ L reaction buffer [50 mM K_2HPO_4 (Vetec), 50 mM KH_2PO_4 (Vetec) pH 7.0, 3.5 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium azide (Sigma-Aldrich) and 0.12 mM NADPH (Sigma-Aldrich)] and 100 μ L H_2O_2 (0.8 mM, Vetec), prior to reading absorbance at 340 nm at 0 and 60 s. Enzyme activity was estimated using the equation: GPx concentration = $(A_0 - A_{60})/MEC$, where the MEC of NADPH is 6.2 mM/cm. Results were expressed as mM NADPH/g hemoglobin.

2.4.6 Determination of total protein content

Total protein content was quantified by the Bradford method (1976). To 25 μ L of sample (blood or erythrocyte homogenate) was added distilled water until a 100- μ L volume was attained. Next, 2.5 mL was added of Bradford's reagent (100 mg Coomassie Blue dye, 50 mL of 95% ethanol, 100 mL H_2PO_4) plus distilled water to attain a final volume of 1 L. The sample was shaken and then allowed to rest for 5 min. Absorbance was read at 595 nm and results were interpolated on a standard bovine serum albumin (BSA) curve at a concentration range of 10 to 200 μ g/mL.

2.4.7 Determination of hemoglobin

Hemoglobin was determined using a Beckman Coulter AcT Diff hematology analyzer.

2.5 Statistical analysis

Descriptive analysis was performed and measures of central tendency were determined, subsequently testing the normality and homoscedasticity of the values obtained. To find significant differences between study group variables, Kruskal-Wallis one-way analysis was performed, followed by Dunn's multiple comparisons test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1 General characteristics of the study population

The total number of OE individuals was 30; 100% were women, with a mean age of 32 years (range 25-35 years). Control group individuals numbered 30; 100% were women, with a mean age of 34 years (range 25-35 years).

Mean time in an antineoplastic drug-related job for OE participants was 4 years (range 2-9 years), suggesting chronic exposure to a wide spectrum of antineoplastic medications including cisplatin, etoposide, gemcitabine, doxorubicin, docetaxel, paclitaxel, vinorelbine and carboplatin. As regards the use of protective equipment during work, 100% of OE participants said they did not use face masks, gloves, surgical caps, protective eyewear or lab coats.

Since none of the nurses in the OE group use protective equipment, they come in greater contact with diverse antineoplastic agents via any one of the potential absorption routes

(dermal, inhalatory, digestive, or through the mucosa) which, combined with different temperature gradients and lack of adequate ventilation, poses increased risks to their health. It is worth noting that in the lifestyle questionnaire, 16 OE group nurses reported working a second shift in private hospitals, where they performed similar activities but with fewer safety measures.

The control group did not carry out any activities associated with antineoplastic drug preparation or handling.

3.2 Oxidative stress markers

3.2.1 LPX determination

LPX results obtained in blood samples of the study population (Fig. 1) show a significant increase ($p \leq 0.05$) in the OE group (244.8%) compared to the control group.

3.2.2 PCC

PCC results (Fig. 2) in the OE group show a significant 215.9% increase compared to the control group ($p \leq 0.05$).

3.2.3 SOD activity

A marked increase in SOD activity was found in nurses in the OE group (176.4%) compared to control group individuals ($*p \leq 0.05$) (Fig. 3).

3.2.4 CAT activity

A 170.5% increase in CAT activity occurred in the OE group with respect to the control group ($p < 0.05$) and was statistically significant (Fig. 4).

3.2.5 GPx activity

GPx results (Fig. 5) in the group of OE nurses show a significant 371.3% increase compared to the control group ($p \leq 0.05$).

4. DISCUSSION

Results of the present study show increases in LPX and PCC in the group of nurses occupationally exposed to the preparation and handing of antineoplastic drugs, with respect to the control group ($p < 0.05$). Neoplastic disease studies reveal that treatment with antineoplastic medications increases oxidative stress and reduces plasma levels of vitamins C and E as well as of glutathione peroxidase. ⁽²⁵⁾

Diverse antineoplastic agents have been associated with oxidative stress. For example, cisplatin induces formation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria, eliciting oxidative alterations in lipids, proteins and DNA of this organelle (Santadreu et al. 2010), while doxorubicin-induced cytotoxicity has been associated with ROS production and in particular to presence of the superoxide anion radical and of hydrogen peroxide (Deng et al. 2007; Wagner et al. 2005). This pharmaceutical is also able to produce reactive nitrogen

species (RNS) such as peroxynitrite (Stuehr et al. 2001). It is worth noting that both medications are prepared, handled and administered by nursing personnel in hospitals participating in the present study.

The increases in LPX and PCC found in our study may be explained by an increase in the number of radical species produced by the biotransformation of antineoplastic drugs in OE nurses, such as superoxide anion and hydrogen peroxide which are known to attach to membrane lipids, inducing their lipid peroxidation. Similarly, increased peroxynitrite concentrations may oxidize directly the prosthetic protein group or else react directly with the peptide chain, leading to conformational and functional changes with severe biological consequences for the individual (Denicola and Radi 2005).

Paradoxically, oxidative stress induced by oxidative metabolism of antineoplastic drugs interferes with the tumoral growth produced in different types of cancer, since one of the indicators of this process –increased lipid peroxides –favors the prolongation of cell quiescence (G₀ phase). The problem lies in the fact that cytostatic or chemotherapeutic agents act while malignant cells are in constant replication, not when they are quiescent (Bernuzzi et al. 2009; Quiles et al 2002; Kimura et al. 2000; Gewirtz 1999).

Likewise, antioxidant capability has been reported to be greater in tumoral cells than in normal cells (Gewirtz 1999), but this effect is surpassed by the oxidative stress induced by antineoplastic agents. Short-lived cells or cells with higher renewal rates which are constantly being regenerated are the most affected, in addition to the fact that there are other undesirable effects associated with FR generation, such as doxorubicin-induced cardiac toxicity (rapid heartbeat, heart failure), bleomycin-induced pulmonary fibrosis and

cisplatin-induced ototoxicity (Lu and Cederbaum 2005; Lu et al. 2005; Sugihara and Gemha 1986).

During a person's lifetime, a sophisticated antioxidant network counteracts the deleterious action of ROS on macromolecules (Tilman 2005). Cells synthesize some of their own antioxidants, as do also SOD, CAT and GPx as well as peptides with thiol groups, such as glutathione (GSH) and the thioredoxin (TRX) family. These systems play a major role in the ability of the body to respond to the oxidative challenge of using molecular oxygen to drive reactions that yield the necessary energy.

Increased ROS production is known to be associated with increases in antioxidant enzyme activity. A marked increase in SOD activity occurred in our study in the OE group (176.4%) compared to the control group (* $p \leq 0.05$) (Fig. 3). Comparison of CAT activity results between study groups found a 170.5% increase of this activity in the OE group, which differed significantly from activity in the control group ($p < 0.05$) (Fig. 4). Finally, GPx results (Fig. 5) in the OE group showed a significant 371.3% increase compared to the control group ($p \leq 0.05$).

SOD is the first mechanism of antioxidant defense and the main enzyme responsible for offsetting toxic effects induced by the presence of ROS, particularly the superoxide ion, which is formed as a minor product of mitochondrial respiration. Increased SOD activity in our study may be explained by high levels of the superoxide anion radical, which can stimulate this activity. It is well known that the enzyme SOD is known to transform O_2^* to H_2O_2 .

Subsequently, the enzyme CAT takes part in the catalytic reaction that decomposes two molecules of the hydrogen peroxide –formed by dismutation of superoxide – into water and oxygen, without the use of cofactors. This function is shared with GPx which uses GSH as a reducing agent (Newman and Unger 2003).

The increase in CAT and GPx may be due to higher levels of hydrogen peroxide, since the oxidative metabolism of pharmaceutical agents such as doxorubicin, to which nurses in our study were exposed, is known to increase the levels of peroxide, which is a specific substrate of GPx.

5. CONCLUSIONS

Nurses occupationally exposed to preparation and handling of antineoplastic drugs are at potential risk of increasing their levels of oxidative stress by not taking preventive and protective measures. Determination of a set of oxidative stress biomarkers is important for early detection of their toxic effects in order to prevent health damage in the exposed population.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was made possible by financial support provided by the Research and Advanced Studies Division of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM, project 3086/2011).

REFERENCES

- Sohal R. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 37-44.
- Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006; 13: 129-142.
- Ferri J, Martinez-Hervas S, Espinosa O, Fandos M, Real P, Real JT. 8-oxo-dihydro-2'-deoxyguanosine as a marker of DNA oxidative stress in individuals with combined familiar hyperlipidemia. *Med Clin Barc* 2008; 7: 1-4.
- Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007 21: 68–75.
- Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Boehm D, Berdowska I, Zielinski B, Noczynska A. Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction. *Clin Biochem* 2008 41: 943–949.
- Millar TM, Phan V, Tibbles LA. ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment. *Free Rad Biol Med* 2007; 42: 1165-1177.
- Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia–reperfusion injury *Ann Vasc Surg* 2005; 19: 2838–2849.
- Mucci M, Ianni A, Ursini C, Orsini M, Arzani D, Ramano SV. Cytostatic drugs and health risks for exposed personnel: search for new biomarkers. *Adv Cancer Res* 2000 20: 2995–3000.

-
- Marczak A, Józwiak Z. Damage to the cell antioxidative system in human erythrocytes incubated with idarubicin and glutaraldehyde. *Toxicol in Vitro* 2009; 23: 1188-1194.
- Rybak L, Whitworth C, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hear Res* 2007; 226: 157-167.
- Scheibmeir H, Christensen K, Whitaker S, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce J. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Int Crit Care Nur* 2005; 21: 24-28.
- Zhang S, Zhang H, Li D, Sun L, Ma C, Wang W, Wan J, Qu B. A novel benzotriazole derivative inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells by increasing oxidative stress concomitant mitochondrial damage. *Eur J Pharmacol* 2008; 584: 144-152.
- McDiarmid M, Egan T. Acute occupational exposure to antineoplastic agents. *J Occup Med Toxicol* 1988; 30: 984-987.
- Fuchs J, Hengstler D, Jung D, Hiltl G, Konietzko J, Oesch F. DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mut Res* 1995; 342: 17-23.
- Valanis B, Vollmer W, Steele P. Occupational exposure to antineoplastic agents: self reported miscarriage and stillbirths among nurses and pharmacists. *J Occup Environ Med* 1999; 41: 632-638.
- Turci R, Sottani C, Rochi A, Minoia C. Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicol Letters* 2002; 134: 57-64.

-
- Gao S, Mobley A, Miller C, Boklan J, Chandra J. Potentiation of reactive oxygen species is a marker for synergistic cytotoxicity of MS-275 and 5-azacytidine in leukemic cells. *Leuk. Res* 2008; 32: 771-780.
- Rombaldi C, Cassini M, Salvador J, Saffi B, Erdtmann. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis* 2009; 24: 143-148.
- Büege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346-357.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, KM Bush, Carpo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1991; 266: 22028-22034.
- Gunzler W, Flohe-Clairborne A. Glutathione peroxidase. *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, pp. 285–290
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis E, Papaefthimiou M, Sigala C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos D. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cel Cardiol* 2007; 42: 549-558.

-
- Santadreu FM, Roca P, Oliver J. Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Rad Biol Med* 2010; 49: 658-666.
- Deng S, Kruger A, Kleschyov AL, Kalinowski L, Daiber A, Wojnowski L. Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. *Free Rad Biol Med* 2007; 42: 466-473.
- Wagner BA, Evig CB, Reszka KJ, Buettner GR, Burns CP. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in Pc3 prostate cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 2005; 440: 181-190
- Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitricoxide synthases. *J Biol Chem* 2001; 276: 14533-14536.
- Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 2005; 208: 273-288
- Bernuzzi F, Recalcati S, Alberghini A, Cairo G. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chem Biol Interact* 2009; 177: 12-20.
- Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727-741.
- Kimura T, Fujita I, Itoh N, Muto N, Nakanishi T, Takahashi T, Azuma J, Tanaka K. Metallothionein acts as a cytoprotectant against doxorubicin toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 299-302.

-
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79-95.
- Sugihara K, Gemba M. Modification of cisplatin toxicity by antioxidants. *Jpn J Pharmacol* 1986; 40: 353-355.
- Lu Y, Kawashima A, Horii I, Zhong L. Cisplatin-induced cytotoxicity in BSO-exposed renal proximal tubular epithelial cells: sex, age, and species. *Ren Fail* 2005; 27:629–633.
- Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci* 2005; 89: 515-523.
- Tilman G. Oxidants and antioxidants defense systems. In: *The handbook of environmental chemistry 2.0*. New York: Springer Berlin Heidelberg. 2005.
- Newman M, Unger M. *Fundamentals of ecotoxicology*, Lewis Publishers. United States of America, 2003, 2a edition, p. 458.



Figure captions

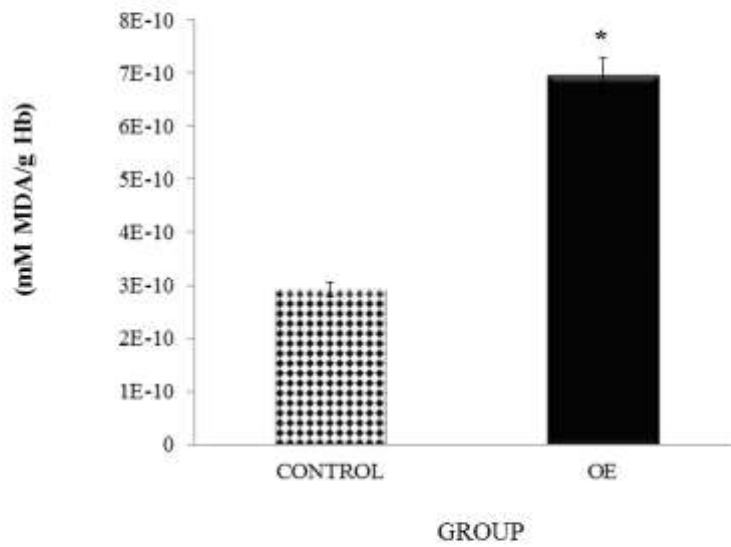


Figure 1 LPX in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation.

The mean for the total number of individuals in each study group is shown. Error bars indicate standard deviation. *Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$.

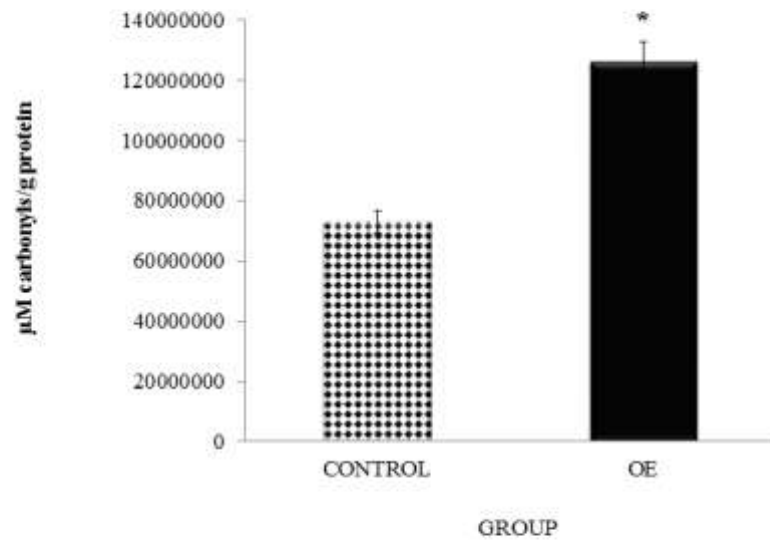


Figure 2 PCC in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation. The mean for the total number of individuals in each study group is shown. Error bars indicate standard deviation. *Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$.

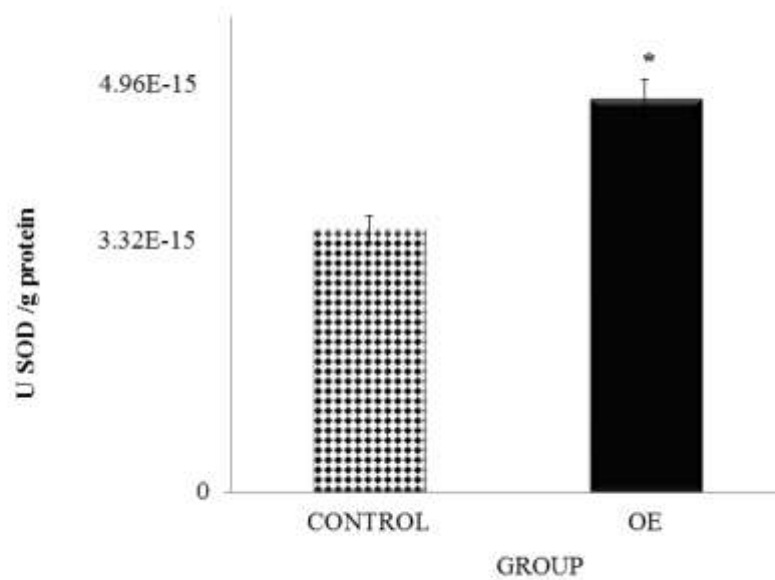


Figure 3 SOD activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation. The mean for the total number of individuals in each study group is shown. Error bars indicate standard deviation. *Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$.

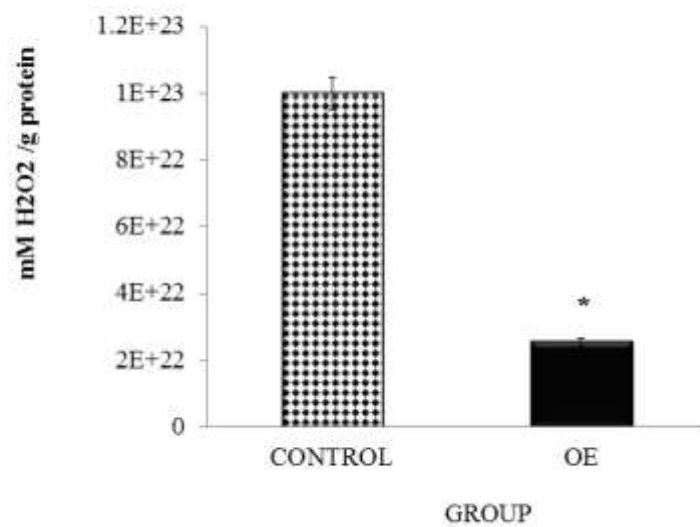


Figure 4 CAT activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation. The mean for the total number of individuals in each study group is shown. Error bars indicate standard deviation. *Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$.

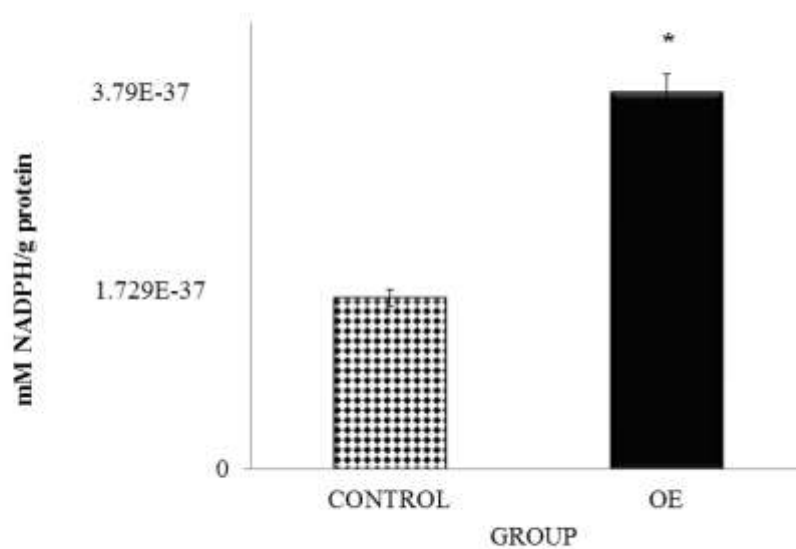


Figure 5 GPx activity in nurses occupationally exposed to antineoplastic drug preparation. The mean for the total number of individuals in each study group is shown. Error bars indicate standard deviation. *Significantly different from the control group at $p \leq 0.05$.

3. Conclusiones

El personal de enfermería ocupacionalmente expuesto a la preparación y manejo de medicamentos antineoplásicos están en un riesgo potencial en el incremento de sus niveles de estrés oxidativo por no tener las medidas preventivas y de protección necesarias.

La determinación de una batería de Biomarcadores de estrés oxidativo es importante para la detección temprana de los efectos tóxicos para prevenir daño a la salud en el personal expuesto.

4. Referentes bibliográficos

1. DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
2. Chabner BA, Longo DL. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice , 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
3. Hoppe R, Textbook of Radiation Oncology , 3rd ed. Elsevier, 2010.
4. Katzung B, Masters S, Trevor A, Chu E, Sartorelli A. Basic and clinical pharmacology. 11th Ed. Ed Mc Graw Hill. 2010. 54: 949 – 976.
5. Chu E, DeVita VT Jr, Cancer Chemotherapy Drug Manual 2011, 11th ed. Jones & Bartlett, 2010.
6. Kufe D. Cancer Medicine , 7th ed. BC Decker, 2006.
7. Kantoff PW, Prostate Cancer, Principles and Practice . Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
8. Mendelsohn J et al, The Molecular Basis of Cancer . WB Saunders, 2008.
9. Weinberg RA, Biology of Cancer. Taylor & Francis, 2006.
10. DeVita VT, Chu E: The history of cancer chemotherapy. Cancer Res 2008; 68: 8643.

-
11. Redmond KM et al, Resistance mechanisms to cancer chemotherapy. *Front Biosci* 2008; 13: 5138.
 12. Sohal R. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 33, Issue 1, 1 July 2002, 37-44.
 13. Singh U. Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, Volume 13, Issue 3, August 2006, 129-142
 14. Andreadou I. Sigala F. Iliodromitis E. Papaefthimiou M. Sigalas C. Aligiannis N. Savvari P. Gorgoulis V. Papalabros E. Kremastinos D. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 42, Issue 3, March 2007, 549-558.
 15. Gao S. Mobley A. Miller C. Boklan J. Chandra J. Potentiation of reactive oxygen species is a marker for synergistic cytotoxicity of MS-275 and 5-azacytidine in leukemic cells. *Leukemia Research*, Volume 32, Issue 5, May 2008, 771-780.
 16. Rombaldi C, Cassini M, Salvador J, Saffi and Erdtmann B. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis*. Vol 24 No 2. 2009.
 17. Mucci M, Ianni A, Ursini C, Orsini M, Arzani D, Ramano S.V. Cytostatic drugs and health risks for exposed personnel: search for new biomarkers. *Advances in Cancer Research*. 2000; 20:2995–3000.
 18. Karapidaki A. Bakopoulou A. Papageorgiou Z. Iakovidou E. Mioglou S. Nikolaropoulos D. Mourelatos T. Lialiaris, T. Genotoxic, cytostatic, antineoplastic and apoptotic effects of newly synthesized antitumour steroidal esters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 675, Issues 1-2, 30 April 2009, 51-59.
 19. Marczak A. Józwiak Z. Damage to the cell antioxidative system in human erythrocytes incubated with idarubicin and glutaraldehyde. *Toxicology in Vitro*, Volume 23, Issue 6, September 2009, 1188-1194.
 20. Rybak L. Whitworth C. Mukherjea D. Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research*, Volume 226, Issues 1-2, April 2007, 157-167.
 21. Scheibmeir H. Christensen K. Whitaker S. Jegaethesan J. Clancy R. Pierce J. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, Volume 21, Issue 1, February 2005, 24-28.
 22. Zhang S. Zhang H. Li D. Sun L. Ma C. Wang W. Wan J. Qu B. A novel benzotriazole derivative inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells by increasing

-
- oxidative stress concomitant mitochondrial damage. *European Journal of Pharmacology*, Volume 584, Issue 1, 14 April 2008, 144-152
23. Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, Hengge U. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cellular Signalling*, Volume 20, Issue 2, February 2008, 311-322.
 24. McDiarmid M, Egan T. Acute occupational exposure to antineoplastic agents. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. Volume 1. Issue 30. 1998, 984-987.
 25. Fuchs J, Hengstler D, Jung D, Hiltl G, Konietzko J, Oesch F. DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mutation Research*. 1995. 342:17-23.
 26. Valanis B, Vollmer W, Labuhn K, Glass A. Acute symptoms associated with antineoplastic drug handling among nurses. *Cancer Nurse*. 1993. 16:288-295.
 27. Sotaniemi E.A, Sutinen S, Arranto A.J. Liver damage in nurses handling cytostatic agents. *Acta Medica Scandinavica*. 1983. 214:181-189
 28. Harris P, Conner T, Stevens K, Thesis J. Cytogenetic assessment of occupational exposure of nurses to antineoplastic agents. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 1992. 1:243-254.
 29. Skov T, Maarup B, Olsen J, Rorth M, Winthereik H, Lynge E. Leukaemia and reproductive outcome among nurses handling drugs. *British journal of industrial medicine*. Volume 1, Issue 49, 1992, 855-861.
 30. Stucker I, Caillard J, Collin R, Poyen D, Hemon D. Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. *Scandinavica Journal of Work and Environ Health*. 1990. 17:133-138.
 31. Valanis B, Vollmer W, Steele P. Occupational exposure to antineoplastic agents: self reported miscarriage and stillbirths among nurses and pharmacists. *Journal of Occupational Environmental Medicine*. 1999. 41:632-638.
 32. Turci R, Sottani C, Rochi A, Minoia C. Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicology Letters*. 2002. 134:57-64.
 33. Baker E, Connor T. Monitoring occupational exposure to cancer chemotherapy drugs. *American Journal of Hospital Pharmacy*. 1996. 53:2713-2723.
 34. Crudi C, Stephen B, Maier P. Possible occupational hazards associated with the preparation, administration of antineoplastic agents. *National Institute for Trial Advocacy* 1982. 5:264-266.
 35. Buege J. A, Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978. 12:302-10.

-
36. Levine R.L, Williams J.A, Stadtman E.R, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 1994. 233, 346-57.
 37. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 1984. Vol. 105, 121 -126.
 38. Misra H.P, Fridovich I. The role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 1972. 247(10), 3170-3175.
 39. Radi R, Turrens J.F, Chang L.Y, Bush K.M, Carpo J.D, Freeman B.A. Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1991. 266 (32), 22028-22034.
 40. Paglia DE, Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Biological Chemistry* 1967. 70, 158-169.
 41. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. 72:248 – 254.