

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina Mexicali



“Efecto de la Hidroxicloroquina sobre Marcadores Séricos de Estrés Oxidativo en Ratas de Raza Wistar Albino”

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta

José Alonso Rodríguez Padrés

Director de Tesis

Dr. Raúl Díaz Molina

Mexicali, Baja California

Octubre de 2024

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina Mexicali

“Efecto de la Hidroxicloroquina sobre Marcadores Séricos de Estrés
Oxidativo en Ratas de Raza Wistar Albino”

Autor de la Tesis

José Alonso Rodríguez Padrés

Universidad Autónoma de Baja California

Tutor y Director de Tesis

Dr. Raul Díaz Molina

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Sinodal

Dr. Víctor Guadalupe García González

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Sinodal

Dr. Octavio Galindo Hernández

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Sinodal

Dr. José Luis Vique Sánchez

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Carta de Dictamen de la Evaluación Escrita del Examen de Grado

Agradecimientos

A mis padres por el incondicional apoyo y el eterno aliento, siendo mi motor para continuar y mi ejemplo para trabajar siempre por lograr mis metas en este trayecto, así como piezas clave para sobrevenir adversidades y salir adelante.

Al Dr. Raúl Díaz Molina, mi tutor, por siempre orientarme, impulsarme, enseñarme, por su perseverancia, por su paciencia, por su ayuda para expandir mis conocimientos y capacidades, por creer y confiar en mi para la conducción del proyecto, por su atención, retroalimentación y empeño.

Al M.V.Z. Daniel Dávila por su incesante apoyo en la valoración, atención y monitoreo de nuestros sujetos de estudio.

A la Dra. Josefina Ruíz-Esparza por sus enseñanzas y contribuciones durante el desarrollo del proyecto.

A Javier Vasconcelos por su apoyo incondicional y su constante disposición para aprender y trabajar en equipo a lo largo de nuestros proyectos entrelazados.

A los Dres. Elisa Vásquez, Ernesto Cardiel, Fernando Aguirre y Ricardo Huarqui por su apoyo y colaboración en el desarrollo experimental del proyecto, actuando con profesionalismo, humanidad, responsabilidad y proactividad.

A la Facultad de Medicina de Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California por haber brindado tanto apoyo y las facilidades para desarrollar este proyecto en sus instalaciones.

Dedicatoria

A Dios, a mis padres y a mis abuelas, a quienes dedico todos mis proyectos, esfuerzos, logros y metas alcanzadas.

Abreviaturas

μM	Micromolar
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
AAF	Anticuerpos IgG antifosfolípidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDCQ	Bidesetil-cloroquina
CAT	Capacidad antioxidante total
CMH-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
Col-HDL	Colesterol en lipoproteínas de alta densidad
Col-LDL	Colesterol en lipoproteínas de baja densidad
COT	Capacidad oxidante total
CQ	Cloroquina
CTE	Cadena de transporte de electrones
DHCQ	Desetil-hidroxicloroquina
DCQ	Desetil-cloroquina
D.O.	Densidad óptica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERON	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
Fr	Escala francesa para medida de calibres de sondas y catéteres
g	Gramos
GR	Glutación reductasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HbA1C	Hemoglobina glucosilada
HCQ	Hidroxicloroquina

IEO	Índice de estrés oxidativo
IFN	Interferón
IL	Interleucina
Kg	Kilogramos
MAO	Monoaminoxidasa
MAPK	Protein quinasa activada por mitógeno
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato
NF κ B	Factor de transcripción nuclear kappa B
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
PAOP	Productos avanzados de la oxidación de proteínas
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Potencial de la constante de disociación iónica
Redox	Óxido-reducción
RL	Radicales libres
RPM	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa

Listado de Tablas

<i>Tabla 1.</i> Clasificación de antioxidantes según el sitio donde ejerce su acción.....	15
<i>Tabla 2.</i> Principales ejemplos de antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno.....	17
<i>Tabla 3.</i> Parámetros farmacocinéticos promedio para una administración oral de 200 mg de sulfato de HCQ, mezcla racémica.....	32
<i>Tabla 4.</i> Principales biomarcadores de estrés oxidativo y daño biomolecular.....	45
<i>Tabla 5.</i> Principales moléculas antioxidantes utilizadas como biomarcadores en estrés oxidativo.....	45
<i>Tabla 6.</i> Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo control al inicio y final del tratamiento.....	54
<i>Tabla 7.</i> Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo experimental de 6.5 mg/kg al inicio y final del tratamiento.....	54
<i>Tabla 8.</i> Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo experimental de 35 mg/kg al inicio y final del tratamiento.....	54
<i>Tabla 9.</i> Valores de media de concentración y desviación estándar para marcadores séricos de daño por estrés oxidativo y actividad pro y antioxidante.....	55
<i>Tabla 10.</i> Prueba de homogeneidad de varianzas de las variables dependientes previo al inicio de la intervención farmacológica.....	56
<i>Tabla 11.</i> Prueba de homogeneidad de varianzas de las variables dependientes terminada la intervención farmacológica.....	56
<i>Tabla 12.</i> ANOVA de una vía entre grupos, previo a intervención farmacológica.....	57
<i>Tabla 13.</i> ANOVA de una vía entre grupos, posterior a la intervención farmacológica..	57
<i>Tabla 14.</i> Valores de significancia p para las pruebas 't' de Student entre medias antes-después de la intervención farmacológica.....	60

Listado de Figuras

<i>Figura 1.</i> Esquema de la reducción sucesiva de O ₂ a H ₂ O.....	6
<i>Figura 2.</i> Especies reactivas de oxígeno, principales formas y fuentes.....	8
<i>Figura 3.</i> Esquema de la NADPH oxidasa de células fagocíticas.....	10
<i>Figura 4.</i> Esquema de las reacciones catalizadas por XOR.....	11
<i>Figura 5.</i> Esquema del proceso de oxidación catalizado por citocromo P ₄₅₀	12
<i>Figura 6.</i> Esquema de la desaminación oxidativa de monoaminas por la MAO.....	13
<i>Figura 7.</i> Transferencia de electrones de NADPH a GPx a través de la glutatión reductasa (GR) y GSH.....	21
<i>Figura 8.</i> Sulfato de hidroxiclороquina.....	29
<i>Figura 9.</i> Difosfato de cloroquina.....	29
<i>Figura 10.</i> Gráficos de caja para las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo en cada grupo experimental previas al tratamiento.....	58
<i>Figura 11.</i> Gráficos de caja para las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo en cada grupo experimental una vez terminado el tratamiento.....	59
<i>Figura 12.</i> Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador de estrés oxidativo al inicio y al final del tratamiento para el grupo control.....	61
<i>Figura 13.</i> Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador al inicio y al final del tratamiento para el grupo experimental A (6.5 mg/kg).....	62
<i>Figura 14.</i> Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador al inicio y al final del tratamiento para el grupo experimental B (35 mg/kg).....	63

Resumen

En décadas recientes la hidroxiclороquina (HCQ) ha sido utilizada en el manejo de enfermedades reumáticas como el lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, condiciones crónicas que requieren tratamientos prolongados o permanentes. El uso de HCQ por periodos muy largos ha demostrado tener efectos adversos irreversibles. Gran parte de los efectos adversos de los fármacos se asocia a una condición de estrés oxidativo causado por la propia sustancia. Este estudio de tipo correlacional, prospectivo, longitudinal, aleatorizado, con intervención farmacológica, busca conocer si existe una correlación entre el uso de HCQ y daño oxidativo mediante mediciones de la concentración de marcadores de estrés oxidativo, efectuadas sobre tres grupos de ratas: un grupo control y dos grupos experimentales tratados con HCQ. En el grupo tratado con una dosis terapéutica de HCQ (6.5 mg/kg/día) se observó un aumento significativo en la capacidad oxidante total, mientras que en el grupo tratado con una dosis supraterapéutica (35 mg/kg/día) se observó un aumento significativo en los niveles de malondialdeído. Se observan tendencias de aumento en niveles de marcadores de daño oxidativo (proteínas oxidadas, malondihaldeído, índice de estrés oxidativo) y de disminución en la capacidad antioxidante total una vez terminado el tratamiento; un estudio de diseño similar pero mayor duración ayudaría a evaluar esas tendencias y a establecer una correlación entre el tiempo de tratamiento con HCQ y el comportamiento de estos marcadores, permitiendo hacer más conjeturas entre la posible asociación de los efectos adversos de este fármaco con el estrés oxidativo.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del problema.....	3
2.1. Pregunta de investigación	4
3. Marco teórico	5
3.1. Metabolismo aeróbico	5
3.2. Estrés oxidativo	5
3.3. Moléculas prooxidantes.....	7
3.3.1. Fuentes no enzimáticas.....	9
3.3.2. Fuentes enzimáticas.....	10
3.3.3. ERO involucradas en procesos de señalización celular.....	14
3.4. Moléculas antioxidantes.....	14
3.4.1. Antioxidantes no enzimáticos.....	16
3.4.2. Antioxidantes enzimáticos.....	19
3.5. Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedades.....	21
3.6. Relación de fármacos con desarrollo de estrés oxidativo.....	27
3.7. Hidroxicloroquina.....	29
3.8. Medición de indicadores de estrés oxidativo.....	43
4. Justificación.....	46
5. Objetivos.....	47
6. Hipótesis.....	48
7. Metodología	49
7.1. Tipo de estudio.....	49
7.2. Tamaño de muestra	49
7.3. Modelo animal y tratamiento.....	49
7.5. Análisis estadístico	52
7.6. Aspectos éticos	52
8. Resultados	53
8.1. Fase experimental: estandarización de metodologías y medición de marcadores.....	53
8.2. Procesamiento estadístico de datos.....	55
8.2.1. Análisis de homogeneidad de varianzas.....	55

8.2.2. Análisis de medias entre grupos experimentales previo a la intervención farmacológica.	56
8.2.3. Análisis de medias entre grupos experimentales posterior a la intervención farmacológica.	57
8.2.4. Análisis de medias antes y después de la intervención farmacológica.	60
9. Discusión.	64
10. Conclusiones.	70
11. Referencias bibliográficas.....	71

1. Introducción.

Las moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno se denominan especies reactivas de oxígeno (ERO). Esta reactividad es principalmente atribuida a la presencia de electrones no apareados en las estructuras de algunas de estas moléculas, aunque existen otras especies reactivas que no son de naturaleza radicálica, como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno diatómico (Deavall et al., 2012). Las ERO se originan por diversas vías metabólicas durante procesos fisiológicos como la obtención de energía y el metabolismo de biomoléculas, y son utilizadas en procesos normales de señalización celular, homeostasis, respuesta celular inmune, etc., que pueden verse modificados por factores genéticos y ambientales promoviendo una sobreproducción de estas especies químicas (Noori, 2012). Debido a su reactividad, las ERO pueden oxidar lípidos de membrana, proteínas y ADN generando, como consecuencia, una disfunción de la célula e incluso muerte celular.

Los antioxidantes son estructuras moleculares de naturaleza enzimática y no enzimática, capaces de prevenir o limitar la oxidación de las biomoléculas, ya sea por interacción y estabilización de ERO, o bien, por la transformación a configuraciones reducidas de las biomoléculas afectadas (Noori, 2012). Esto favorece que las células puedan mantener determinados niveles de daño; sin embargo, debido a una sobreproducción de ERO en respuesta a exposición a tóxicos, radiación o por procesos fisiopatológicos, los sistemas de defensa antioxidante pueden verse superados o disminuidos, incrementándose el daño celular por estrés oxidativo (Deavall et al., 2012).

El estrés oxidativo es un proceso en el cual el balance dinámico redox entre moléculas pro-oxidantes y antioxidantes se encuentra intensamente cargado hacia el potencial oxidativo (Arzu et al., 2008), lo que puede desencadenar efectos perjudiciales para la salud debido al daño celular en lípidos, proteínas y ADN de diversos tejidos (Sezgin et al., 2005). Así, el estrés oxidativo se ha relacionado con patologías que afectan a diversos sistemas, tales como asma, aterosclerosis, cáncer, catarata senil, enfermedad cardiovascular endotelial, insuficiencia renal y hepática, SIDA, enfermedades

neurodegenerativas, y patologías inflamatorias en piel y otros tejidos, como la artritis reumatoide (Noori, 2012; Elejalde-Guerra, 2001). Por otro lado, el envejecimiento se atribuye a la acumulación de lesiones orgánicas por agentes pro-oxidantes, menor actividad proteolítica, disminución en la concentración de agentes antioxidantes y enzimas detoxificadoras, así como a la acumulación de proteínas oxidadas no degradadas (Ames et al., 1993; Elejalde-Guerra, 2001).

Noori (2012) señala que la generación de especies reactivas de oxígeno tiene lugar a partir de tres clases de fuentes importantes: endógenas, exógenas y patológicas. Dentro de las fuentes exógenas se incluye, entre otras, a los fármacos, por sus diversos mecanismos de toxicidad en los que participa el estrés oxidativo.

La hidroxiclороquina (HCQ) es un fármaco que pertenece al grupo de los antimaláricos, con propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras (Chat Ham, 1989), por lo que se utiliza en el manejo de enfermedades reumáticas como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y dermatomiositis. Se absorbe rápidamente después de una administración oral de 200 mg, lográndose una absorción del 74% de la dosis en 1.9 a 10 horas. La vida media es de 3.5 días en plasma y de 50 días en sangre total debido a que tiene alta afinidad por las células sanguíneas. La principal vía de eliminación es la orina. Los niveles terapéuticos se alcanzan a las 2 semanas con una dosis de 400 mg diarios de HCQ, que corresponde a la dosis habitual en el tratamiento de la artritis reumatoide (Rynes, 1997; Browning, 2014).

Tras una amplia revisión bibliográfica, no se encontraron reportes en relación con el efecto de la hidroxiclороquina sobre los niveles sanguíneos de marcadores de daño por estrés oxidativo y la actividad de enzimas antioxidantes.

2. Planteamiento del problema.

El estrés oxidativo es un factor fuertemente implicado como mecanismo de toxicidad a numerosos tejidos y órganos por fármacos tales como antitumorales, antiinflamatorios no esteroideos, antirretrovirales, antihipertensivos, antibióticos, antiepilépticos, antiscótics y analgésicos (Chandran et al., 2014; Ozbek, 2012; Ficarra et al., 2013; Deavall et al., 2012; Saraswathy et al., 2012).

Un fármaco y los productos de su metabolismo pueden generar, por diversos mecanismos, un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, induciendo así estrés oxidativo, el cual pudiera explicar algunas de las reacciones adversas de estos fármacos (Deavall et al., 2012).

La HCQ es una sustancia derivada de la 4-aminoquinolina que pertenece al grupo de los antimaláricos, con propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras (Chat Ham, 1989), que se utiliza en el manejo de enfermedades reumáticas como el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y dermatomiositis (Restrepo, 2006).

Existen efectos adversos asociados al uso de hidroxicloroquina, principalmente alteraciones gastrointestinales y efectos dermatológicos. Estos efectos y otros reportados en la literatura son dependientes de la dosis y se presentan con mayor frecuencia si el fármaco se utiliza por tiempo prolongado (Restrepo, 2006; Wolfe y Marmor, 2010; Melles y Marmor, 2014).

A la fecha existen muy pocos antecedentes sobre el efecto de la hidroxicloroquina sobre los niveles de estrés oxidativo tanto en animales como en humanos, por lo que el presente trabajo resulta de amplio interés, y pudiera dar pie a la realización de otros estudios sobre la toxicidad de este fármaco.

2.1. Pregunta de investigación.

¿Las dosis de 6.5 y 35 mg/kg/día de HCQ administradas vía oral durante tres meses, tendrán efecto sobre los niveles sanguíneos de óxido nítrico (NO), malondialdehído (MDA), productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), capacidad oxidante total (COT), capacidad antioxidante total (CAT) e índice de estrés oxidativo (IEO) en una población de ratas Wistar albino adultas sanas?

3. Marco teórico.

3.1. Metabolismo aeróbico.

En los tiempos del origen de la vida la atmósfera era rica en gas metano, hidrógeno y grandes cantidades de moléculas reductoras. Existían organismos primitivos que utilizaban fuentes abióticas de compuestos orgánicos fermentables para obtención de energía (heterótrofos fermentadores), al igual que organismos quimiótrofos, que basaban su dieta en hidrógeno, sulfuro de hidrógeno y metano, utilizando como aceptores finales de electrones al dióxido de carbono y grupos sulfato (Banerjee, 2008).

Tras el origen de organismos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica aprovechando la energía solar en la oxidación de moléculas de agua, la atmósfera comenzó a saturarse de oxígeno y electrones libres (ecuación 1), orillando a los organismos anaeróbicos a adaptarse para contener la biotoxicidad del oxígeno, confinarse en limitados nichos anaeróbicos o extinguirse.



Esta saturación de oxígeno en la atmósfera propició la evolución de formas de vida que basan su existencia en respiración aeróbica altamente exergónica. Este tipo de metabolismo consiste principalmente en una fosforilación oxidativa, en donde la energía obtenida a partir de una serie de reacciones redox, realizadas en un complejo enzimático multicomponente de NADH deshidrogenasa en la membrana mitocondrial interna (cadena de transporte de electrones, CTE), se convierte en el enlace fosfato de alta energía del ATP. El oxígeno molecular (O_2) funge como aceptor final de electrones de la citocromo-c oxidasa, el componente terminal de la cadena, que cataliza la reducción por cuatro electrones del O_2 a H_2O (Thannickal y Fanburg, 2000).

3.2. Estrés oxidativo.

Sohal y Weindruch (1996) aluden a una hipótesis comúnmente abordada en bioquímica, la cual enuncia que el oxígeno es una sustancia potencialmente tóxica y puede ser perjudicial a largos plazos para los organismos aerobios, a pesar de ser un compuesto

necesario para su supervivencia inmediata. Otros autores (Egea et al., 2017) mencionan que el oxígeno es per se una molécula químicamente agresiva, y su uso por parte de los organismos aeróbicos implica el riesgo de que las biomoléculas que los conforman sufran modificaciones oxidativas resultantes de la formación descontrolada de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON).

El oxígeno molecular es un birradical que, con adiciones de uno, dos o tres electrones respectivamente, genera moléculas parcialmente reducidas que reciben el nombre de especies reactivas de oxígeno (Figura 3.1): anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$); esto debido a sus altas capacidades de reaccionar con otras moléculas, comparadas con O_2 (Figura 1). Estas especies químicas a su vez, mediante reacciones posteriores, pueden formar una serie de metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno (al interactuar con óxido nítrico) (Sohal y Weindruch, 1996).

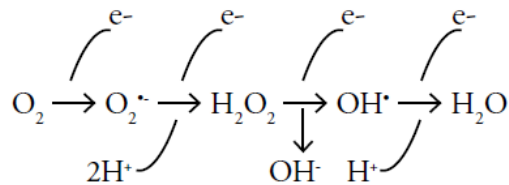


Figura 1. Esquema de la reducción sucesiva de O_2 a H_2O .

Además de la membrana mitocondrial interna, pueden ser producidas en otras regiones celulares en distintos tipos de tejido, como en ácidos grasos peroxisomales, citocromo P-450, leucocitos polimorfonucleares y células fagocíticas y enzima xantina-deshidrogenasa en los endotelios, y así participar en procesos fisiológicos como la fagocitosis, síntesis de colágeno, síntesis de prostaglandinas, activación enzimática, disminución de síntesis de catecolaminas, quimiotaxis, señalización y regulación celular (proliferación, migración) regulación de presión sanguínea y de tono en músculo liso, activación plaquetaria, respuesta hipóxica, inflamación, respuesta inmune (Egea et al., 2017; Thannickal y Fanburg, 2000; Ozbek, 2012; Mayor-Oxilia, 2010; Venereo-Gutiérrez, 2002; Schulz et al., 2014; Görlach et al., 2015); de igual forma participan en la mediación de la apoptosis, reacciones de detoxificación, sanación de heridas, muerte de células

precancerosas; envueltas benéficamente en vías de señalización para mantener la homeostasis celular (Noori, 2012).

No obstante, puede ocurrir una sobreproducción de ERON en respuesta a estímulos como exposición a tóxicos, radiación X y luz ultravioleta, condiciones de hiperoxia, ejercicio forzado, isquemia-reperfusión, condiciones patológicas (activación de neutrófilos), hormonas, factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, metabolismo de nutrientes y detoxificación de xenobióticos, permitiendo que interactúen con biomoléculas en la célula y causen daño oxidativo extensivo. Este daño se manifiesta como peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados de membrana, modificación de cadenas de ADN, carbonilación y pérdida de grupos sulfhidrilo en proteínas, entre otros, resultando en daño y pérdida de funcionalidad a estructuras celulares y acelulares (Deavall et al., 2012; Ozbek, 2012; Sohal, 1996; Berlett y Stadtman, 1997).

El estrés oxidativo representa un desbalance entre la producción de ERON y la habilidad del sistema biológico de detoxificar estos metabolitos reactivos, o bien, reparar el daño oxidativo producido, denominada defensa o capacidad antioxidantes (Schulz et al., 2014). Esta ruptura de equilibrio se puede dar tanto por el aumento descontrolado en la producción de especies prooxidantes, como por un déficit en la defensa antioxidante en cantidad o funcionalidad de sus actores en reparación y remoción de estructuras dañadas (Venereo-Gutiérrez, 2002).

3.3. Moléculas prooxidantes.

Existen diversos procesos de transferencia de electrones en el organismo en los que el aceptor final de éstos es el oxígeno molecular. El O_2 tiene la capacidad de desaparecer sus electrones y así formar radicales libres, lo que la hace una molécula tóxica en condiciones no controladas. Los radicales libres son especies químicas, cargadas o no, que presentan un electrón desapareado en el último orbital de su estructura, dándole una configuración espacial de gran inestabilidad (Venereo-Gutiérrez, 2002) y alta reactividad, pues este electrón tiende a buscar otro con el cual aparearse, lo que da lugar a electrones apareados o a la formación de un nuevo radical libre. En este último caso, el radical es también inestable y puede reaccionar con otra molécula produciendo un nuevo radical

libre o una molécula con electrones apareados, originando así una cadena de radicales libres que, en un medio biológico, puede dañar todo tipo de estructuras celulares y sistemas.

El O₂ se reduce en estos procesos consistentes en reacciones redox por adición sucesiva de electrones, en donde una reducción parcial puede formar especies reactivas de oxígeno (Figura 2), ya sean radicálicas o no radicálicas.

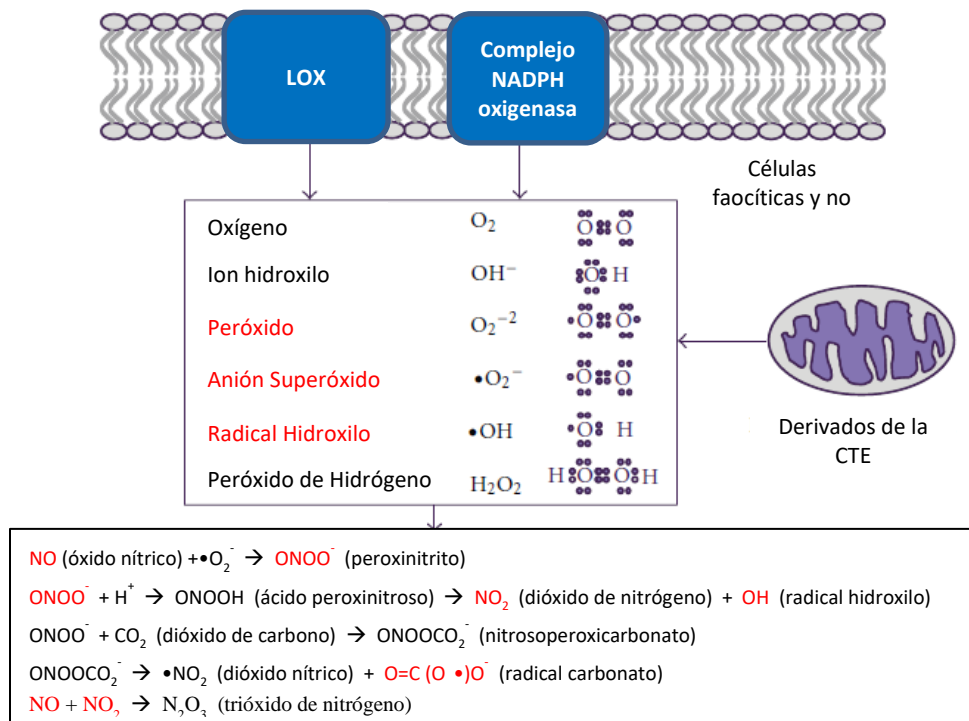


Figura 2. Especies reactivas de oxígeno, principales formas y fuentes. Lox: lipooxigenasa. CTE: cadena de transporte de electrones. Una vez liberadas las especies de oxígeno pueden reaccionar con NO y formar especies reactivas de nitrógeno. En rojo se muestran los radicales libres (electrón no apareado). Tomada de: Deavall et al. "Drug induced oxidative stress and toxicity".

Las ERO se pueden clasificar de la siguiente manera, según Venereo-Gutiérrez (2002):

Radicales libres inorgánicos o primarios: Originados en reacciones de transferencia de electrones por la reducción directa del oxígeno, caracterizados por una vida media muy corta. Anión superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico.

Radicales libres orgánicos o secundarios: Originados por la transferencia de un electrón de un radical primario a una molécula orgánica, o por la reacción de dos radicales primarios entre sí. Su vida media es más larga que la de los primarios.

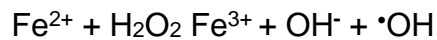
Intermediarios estables: Especies no radicáticas que pueden generar radicales libres o resultan de la reducción o metabolismo de éstos. Oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, peroxinitrito, hidroperóxidos orgánicos, entre otros.

Esta formación de especies reactivas puede ser debida a procesos endógenos diversos o como productos metabólicos, por dos tipos de fuentes: enzimáticas y no enzimáticas.

3.3.1. Fuentes no enzimáticas.

El peróxido de hidrógeno puede ser formado en el organismo por reducción de O₂ o por dismutación del anión superóxido. Éste puede ser recogido y metabolizado por la glutatión peroxidasa, o bien, participar en la formación de especies de oxígeno altamente reactivas como factor en las siguientes reacciones:

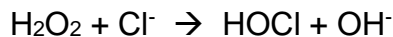
Reacción de Fenton: Formación de ion hidroxilo y radical hidroxilo por reacción con hierro o cobre.



Reacción de Haber-Weiss: Formación de ion hidroxilo y radical hidroxilo por reacción con anión superóxido, catalizada por metales de transición.



Reacción con iones halogenuro para formar ácidos.



La autooxidación de moléculas pequeñas como la dopamina, flavinas, epinefrina e hidroquinonas representa una fuente intracelular de formación de ERON, siendo el producto en la mayoría de los casos $\cdot\text{O}_2^-$ (Thannickal y Fanburg, 2000; Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012).

3.3.2. Fuentes enzimáticas.

En los organismos vivos existe un gran número de enzimas, principalmente oxidorreductasas, que se ven involucradas en la formación de ERO en diversos niveles subcelulares y para distintas implicaciones en metabolismos celulares en condiciones fisiológicas; las principales son:

NADPH oxidasas: La NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática de células fagocíticas (NOX-2) cataliza la reducción monovalente de O_2 a $\bullet O_2^-$, utilizando NADPH como donador de un electrón a través del flavocitocromo b_{558} (proteína transmembranal dimérica formada por $gp91^{phox}$ y $gp22^{phox}$), como mecanismo de defensa contra invasiones de microorganismos (Figura 3). Dos electrones se transfieren del NADPH, en la cara interna de la membrana plasmática, hacia el O_2 fuera de la célula. Durante la fagocitosis, la membrana se internaliza para fungir como pared de una vesícula fagocítica, de manera que la antigua cara externa de la membrana queda hacia adentro de la vesícula, focalizando la producción de $\bullet O_2^-$ y sus metabolitos hacia el agente fagocitado (Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000; Görlach et al., 2015).

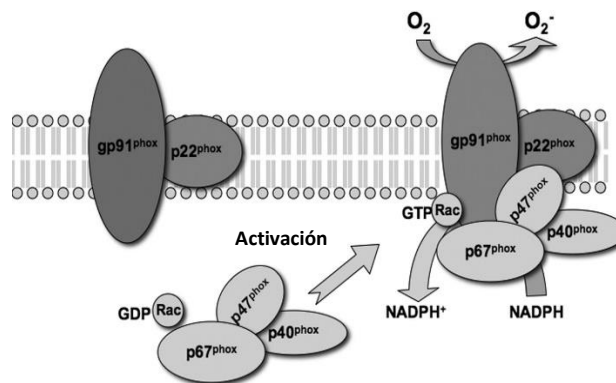


Figura 3. Esquema de la NADPH oxidasa de células fagocíticas. Al haber estímulo externo para iniciar fagocitosis, las subunidades proteicas p47, p67, p40 y Rac se traslocan del citosol a la membrana para anclarse al complejo. Dos electrones se transportan del NADPH citoplasmático al O_2 extracelular para formar $\bullet O_2^-$. Tomada de: Dworakowski et al. *Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species*.

La familia de NOX consiste en siete isoformas de enzimas asociadas a membrana, NOX1-5 y Duox1-2 (actualmente NOX6-7), en que todas catalizan reducción de O_2 para formar ERO (Egea et al., 2017; Kleikers et al., 2012). Su rol y mecanismo de activación son específicos para cada isoforma, así como dependiente de su ubicación en el interior

de la célula y el tipo de tejido en que se expresa, viéndose involucradas en una serie de procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos (Egea et al., 2017). Se encuentran expresadas en células del SNC, endotelio, músculo liso, mesangiales, neuroepiteliales pulmonares, fibroblastos, cardiomiocitos, osteoclastos, condrocitos, hepatocitos, entre otras, formando complejos denominados oxidasas tipo-NADPH, y cumpliendo funciones de defensa del huésped y de señalización celular (Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000; Görlach et al., 2015). El homólogo encontrado en músculo liso vascular, NOX4, es activado por Angiotensina II y por 5-HT, generando $\bullet\text{O}_2^-$ y H_2O_2 (Noori, 2012, Görlach et al., 2015).

Xantina oxidorreductasa (XOR): Oxidasa dependiente de flavina, utiliza hierro y molibdeno como catalizadores. Realiza la conversión de hipoxantina a xantina y, posteriormente, a ácido úrico (Figura 4).

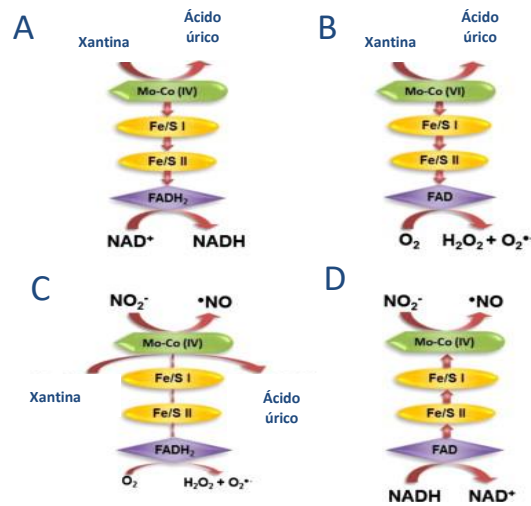


Figura 4. Esquema de las reacciones catalizadas por XOR. A) XDH oxida xantina a ácido úrico y transfiere los electrones mediante dos centros Fe/S al FAD, donde NAD⁺ se reduce a NADH. B) XO oxida xantina a ácido úrico y los electrones son transferidos al FAD, donde O₂ es reducido a $\bullet\text{O}_2^-$ y H₂O₂. Bajo presión normal de O₂ y pH el cofactor molibdeno (Mo-co) se presenta comúnmente de forma oxidada +6 (VI) mientras los electrones se transfieren rápidamente al O₂ en el FAD. C) Los nitritos (NO₂⁻) se reducen por un electrón a •NO en el Mo-co de XO (electrones donados directamente a Mo por la xantina). D) NO₂⁻ se reducen a •NO en el Mo-co de XO (electrones suministrados por NADH y transferidos en sentido contrario reduciendo al Mo). Con bajas presiones de O₂ y pH el Mo-co se presenta en estado reducido +4 (IV) mientras los electrones se transfieren lentamente al O₂. Esto disminuye el flujo de electrones de Mo-co a FAD (representado en imagen 'C' con flechas delgadas), mientras que en 'D', la donación de electrones por NADH al FAD supera la extracción electrónica mediada por O₂ y el flujo ocurre de FAD a Mo-co, indicado por las flechas en sentido contrario. Tomada de Cantu-Medellin y Kelley, 2013.

Existe en dos formas, xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO); la primera se transforma en la segunda de manera reversible por oxidación de grupos sulfhidrilo, e irreversiblemente por proteólisis, tras un corto período de hipoxia (Thannickal y Fanburg, 2000), y en esta forma produce altas cantidades de $\bullet\text{O}_2^-$ y H_2O_2 . Xantina oxidorreductasa puede transformar nitratos a nitritos y a NO, y cataliza la unión de NO y $\bullet\text{O}_2^-$ para formar peroxinitritos (Cai y Harrison, 2000; Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000; Görlach et al., 2015).

Citocromo P₄₅₀ oxidasa (cyp450): Enzima con grupo 'hem' en su estructura. Participante en catabolismo y anabolismo de diversas sustancias endógenas, así como catabolismo de xenobióticos, catalizando la transferencia intramolecular de oxígeno (Figura 5) (Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000).

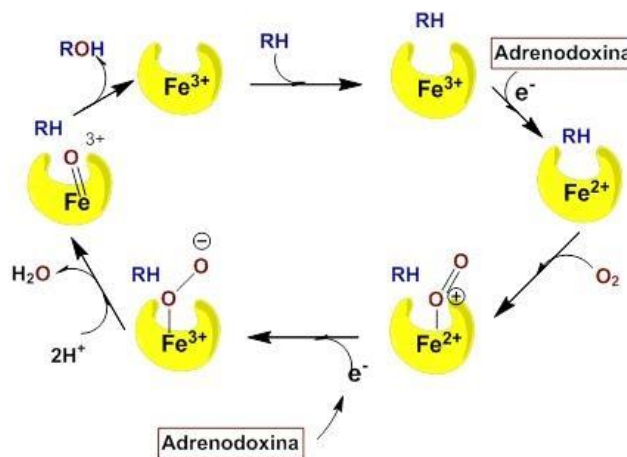


Figura 5. Esquema del proceso de oxidación catalizado por citocromo P₄₅₀. La adrenodoxina introduce al sistema los electrones aportados por NADPH, donde uno de ellos reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} , lo que permite que cyp450 se enlace al O_2 . Formada esta unión, el complejo acepta un segundo e^- de la adrenodoxina, generando un enlace covalente (O-O). Uno de los átomos de oxígeno se protona y se libera como H_2O . El otro átomo de oxígeno forma un intermediario ferrilo ($\text{Fe}=\text{O}$), altamente inestable y reactivo, que toma un átomo de hidrógeno del sustrato (RH) generando un radical libre. Éste separa a $-\text{OH}$ del hierro (el cual vuelve a estado oxidado Fe^{3+}) para formar ROH.

Mieloperoxidasa: Enzima contenedora de grupo 'hem', encontrada en neutrófilos y eosinófilos. Cataliza la reacción de H_2O_2 con diversos sustratos para formar ácidos hipohalogenosos de cloro, bromo y yodo altamente reactivos (Noori, 2012).

Monoaminoxidasa: (MAO) Localizada en membrana mitocondrial externa. Contiene un grupo 'hem', auxiliar en catálisis de desaminación oxidativa de monoaminas. Producción de H₂O₂ en matriz y citosol (Figura 6) (Noori, 2012).

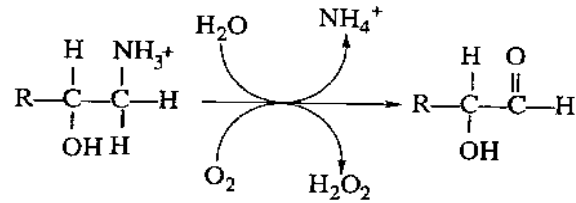


Figura 6. Esquema de la desaminación oxidativa de monoaminas por la MAO.

En los lisosomas, para generar el pH ácido que necesitan las hidrolasas para operar de manera eficiente, parecen contener una cadena redox similar a la existente en la membrana interna de la mitocondria, que contribuye a la distribución de protones, promoviendo una reducción del oxígeno por tres electrones generando ERO por consecuencia. Algunas enzimas lisosomales utilizan hierro y cobre, por lo que estos metales se acumulan en el organelo; la mayor parte del hierro se mantiene divalente por el medio ácido, por lo que es activo para reacciones redox, promoviendo la formación de •OH por reacción de Fenton (Görlach et al., 2015).

Durante el metabolismo del ácido araquidónico se ven envueltas una serie de reacciones oxidativas, mediadas por las enzimas ciclooxigenasa, lipooxigenasa y citocromo p450, que resultan en cualquier número de radicales libres orgánicos, centrados tanto en carbono como en oxígeno (Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000).

Otras oxidasas de tipo citocromo, NADH oxidorreductasas, y sistemas de transporte de electrones encontrados en retículo endoplásmico y membranas nucleares que reducen O₂ a •O₂⁻ y H₂O₂ durante oxidación de ácidos grasos insaturados y xenobióticos (Thannickal y Fanburg, 2000).

Enzimas generadoras de H₂O₂ encontradas en los peroxisomas como: glicolato oxidasa, D-aminoácido oxidasa, L-α-hidroxiácido oxidasa, acil-CoA oxidasa y urato oxidasa, principalmente en hepatocitos y nefrocitos. No obstante, la cantidad de enzimas que lo

producen, poco H_2O_2 logra escapar de la catalasa existente en el interior del organelo (Thannickal y Fanburg, 2000; Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012).

3.3.3. ERON involucradas en procesos de señalización celular.

Ambos tipos de fuentes mencionadas anteriormente se ven involucradas y activadas en medio de diversas vías de señalización celular, en situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

Pueden generarse ERON en distintas de estas vías, entre las que se incluyen aquellas dependientes de calcio, protein-tirosina quinasa, protein-tirosina fosfatasa, serin-treonina quinasa, fosfolipasa, protein quinasa activada por mitógeno (MAPK), $NF_{\kappa}B$, receptores de citoquinas, receptores de crecimiento, receptores acoplados a proteínas-G, receptores de canales iónicos y factor de crecimiento epidérmico. Por otro lado, las ERON producidas, tanto durante señalización celular como durante procesos metabólicos, pueden regular muchas de estas vías mediante dos mecanismos de acción generales: alteraciones en el estado redox en el interior de las células, y modificaciones oxidativas en proteínas (Noori, 2012; Thannickal y Fanburg, 2000).

3.4. Moléculas antioxidantes.

En el organismo existe un conjunto de compuestos químicos cuya función es proteger a las biomoléculas de los ataques de las ERON, y de esta forma evitar daño oxidativo extenso y pérdida de la funcionalidad de células y sistemas, por lo que se les califica como sistema de defensa antioxidante. Se considera como sustancia antioxidante a cualquier molécula que, en concentraciones bajas respecto al sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación de éste, pues poseen una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con los radicales libres y otras ERON (Venereo-Gutiérrez, 2002; Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012; Mayor-Oxilia, 2010).

Su acción es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Actúan tanto en medios hidrofílicos como en medios hidrofóbicos. Fungen como recogedores y eliminadores, con el objetivo

de mantener el equilibrio entre especies prooxidantes y antioxidantes (Venereo-Gutiérrez, 2002). La eficiencia de los antioxidantes se ve afectada por factores como su energía de activación, su potencial de oxidación/reducción, solubilidad, y estabilidad a distintos pH (Noori, 2012).

Las especies antioxidantes se pueden clasificar de distintas maneras: por el lugar en que ejercen su acción, por su origen respecto al organismo, por tipo de biomolécula, por su solubilidad, por el tipo de acción que ejercen (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de antioxidantes según el sitio donde ejerce su acción. (Venereo-Gutiérrez, 2002)

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido Dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-diaforasa		Albúminas
Glutación		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Antioxidantes hidrofílicos: Éstos reaccionan con especies oxidantes encontradas en el citoplasma o el plasma sanguíneo, como el ácido ascórbico (vitamina C, glutación y ácido úrico).

Antioxidantes hidrofóbicos: Protegen a las membranas celulares del daño por peroxidación lipídica, como carotenos, vitamina E y ubiquinol. Estos compuestos pueden ser sintetizados en el organismo u obtenidos de la dieta.

(Noori, 2012).

Por su función se pueden clasificar en:

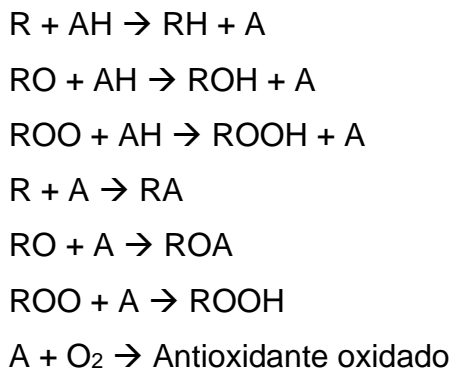
- Primarios. Interrupción de las reacciones en cadena de los radicales libres.
- Secundarios. Captura de ERON.

- Terciarios. Reparación de moléculas oxidadas.

3.4.1. Antioxidantes no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas de diversa naturaleza que no efectúan reacciones enzimáticas, su función es la de capturar y neutralizar a los radicales libres, sacrificando sus propios electrones para aparear y estabilizar a aquellos en el radical. Estas moléculas se oxidan y se transforman en radicales libres estables o no tóxicos, por lo que no permiten la formación de un segundo radical, cortando así las reacciones en cadena de formación de radicales libres (RL). Estos compuestos también tienen una baja energía de activación para donar un átomo de hidrógenos, contribuyendo a la estabilización de los RL.

A continuación, se presenta en forma de un sencillo esquema el mecanismo de acción de los antioxidantes no enzimáticos, donde: R = radical, A = antioxidante, O = oxígeno, H = hidrógeno (Noori, 2012).



Estas moléculas “suicidas” pueden ser exógenas o endógenas, y pueden ser reestablecidas o reducidas por otros antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (Tabla 2) (Mayor-Oxilia, 2010; Gupta, 2015).

Tabla 2. Principales ejemplos de antioxidantes no enzimáticos de origen exógeno.

Molécula	Acción
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singulete; captura a $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{O}_2^-$; neutraliza radicales peroxilo.
Vitamina C	Neutraliza el oxígeno singulete; captura a $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{O}_2^-$; neutraliza hidroperóxidos lipídicos; regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Betacarotenos	Neutralizan oxígeno singulete.
Flavonoides, licopenos	Neutralizan oxígeno singulete. Quelantes de metales.

Estos compuestos son tomados directamente a partir de la dieta por el organismo. De la misma forma, de la dieta se toman los nutrientes necesarios para el anabolismo de otras moléculas que cumplen con funciones antioxidantes en distintos niveles y estructuras dentro y fuera de la célula. Los siguientes son los principales antioxidantes no enzimáticos sintetizados en el organismo:

Glutati6n: El principal tamp6n redox ti6lico, no proteico de la c6lula. Compuesto de bajo peso molecular y distribuci6n tisular variable. Trip6ptido compuesto de glutamato, ciste6ina y glicina. Se encuentra mayormente en su forma reducida (GSH), estado en el que el grupo tiol de la ciste6ina es capaz de donar un equivalente reductor (H^+ y e^-) a mol6culas inestables como las ERO ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\bullet\text{OH}$ principalmente). Al donar un electr6n, el glutati6n se vuelve reactivo, y reacciona de inmediato con otra mol6cula de glutati6n reactivo para formar glutati6n disulfuro (GSSG), un d6mero estable de esta mol6cula en estado oxidado. En tejido sano, existe una raz6n >10:1 de GSH:GSSG en mitocondria y citosol, y de 1:1 en ret6culo endopl6smico; una tasa aumentada hacia GSSG indica estr6s oxidativo (Gupta, 2015; Constanza-Corrales y Mu6noz-Ariza, 2012; Banerjee, 2008).

Ubiquinona: (Ubiquinol, forma reducida). Encontrada en membranas de todas las c6lulas de los organismos aerobios debido a su solubilidad en l6pidos. Encargada del transporte de electrones entre el complejo II y III en la CTE mitocondrial. De igual forma puede aceptar un electr6n, formando el an6n radical estable semiquinona, para neutralizar radicales libres (Banerjee, 2008).

Ácido α -lipoico: Esta molécula anfipática es sintetizada en la mitocondria. Contiene un enlace disulfuro como parte de un anillo pentagonal heterocíclico, que se puede reducir a un ditiol para formar ácido dihidrolipoico con la apertura del anillo. Ambas especies de esta molécula actúan como antioxidantes para EROON particulares, sin embargo, el ácido dihidrolipoico contribuye a la homeostasis redox celular mediante la reducción del ácido deshidroascórbico a ascorbato (Banerjee, 2008).

Ácido úrico: Producto final del catabolismo de las purinas. Posee la capacidad de neutralizar un amplio espectro de EROON, particularmente oxígeno singulete y radicales libres, aceptando un solo electrón para formar un radical estable (Banerjee, 2008).

Bilirrubina: Molécula tetrapirrólica formada durante la degradación del grupo 'hemo'. En concentraciones plasmáticas bajas, la bilirrubina actúa como un potente antioxidante rompiendo la formación en cadena de RL y neutralizando radicales peroxilo. Se une a iones metálicos, evitando que éstos se vean involucrados en la formación de RL. El mecanismo antioxidante de la bilirrubina consiste en oxidarse a sí misma para formar su precursor metabólico no tóxico, biliverdina. Cuando se encuentra unida a albúmina, se oxida por efecto de $\bullet\text{OH}$, HO_2^- y $\bullet\text{O}_2^-$ (en orden descendente de tasas de oxidación), protegiendo a la albúmina, a los ácidos grasos unidos a ella y evitando la formación de grupos carbonilo en proteínas (Kapitulnik, 2004).

Fibrinógeno: El fibrinógeno inhibe la generación de $\bullet\text{O}_2^-$ por autooxidación de pirogalol y acción de xantina oxidasa, oxidación de ion ferroso y degradación de desoxirribosa dependiente de $\bullet\text{OH}$ (Radu et al, 2001). Inhibe la producción de peróxidos. El fibrinógeno es más oxidable que otras proteínas plasmáticas principales. En concentraciones fisiológicas normales muestra mejores propiedades antioxidantes que la albúmina, melatonina y vitaminas C y E, así como mejor actividad que las vitaminas en proporciones equimolares (Kaplan et al., 2001).

Melatonina: Hormona neuroactiva derivada del triptófano. Posee en su estructura un grupo metoxi en la posición 5 de su núcleo indólico, indispensable para que esta molécula funcione como un recolector de $\bullet\text{OH}$, así como un grupo acetilo unido al nitrógeno de su

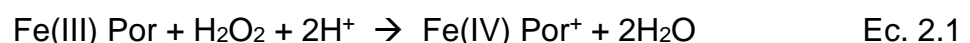
cadena lateral, con una acción sinérgica en la recolección de este radical. También funge como recolector de radicales peroxilo (ROO•) y restringe la lipoperoxidación, evitando su iniciación e interrumpiendo las reacciones en cadena. Se cree que, debido a su naturaleza anfipática, tiene la capacidad de actuar en distintos compartimentos subcelulares, tanto lipídicos como acuosos. El resultado de la donación de e⁻ a •OH por parte de la melatonina es el radical catión indolil, molécula relativamente no reactiva que podría neutralizar a •O₂⁻. Por otro lado, la melatonina estimula la actividad de la glutatión peroxidasa, e inhibe la actividad de la óxido nítrico sintasa (Reiter, 1995).

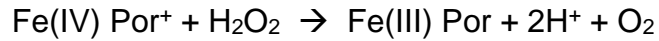
Algunas proteínas de alto peso molecular se unen a metales con actividad redox, limitando así la formación de radicales libres catalizados por metales: la albúmina y la ceruloplasmina se unen a iones de cobre, la transferrina se une a hierro libre (Rathore et al., 2011).

3.4.2. Antioxidantes enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos son estructuras proteicas, sintetizadas en el organismo, que catalizan o aceleran reacciones químicas, utilizando como sustratos moléculas que reaccionan con los RL, descomponiéndolos y removiéndolos del sistema. Eliminan productos de reducciones parciales del O₂, convirtiéndolos en H₂O₂ y, posteriormente, en agua por un proceso secuenciado que requiere de ciertos metales de transición como cofactores. Así mismo eliminan algunos productos de oxidación de biomoléculas por procesos de reducción o de degradación de estos. Las principales enzimas antioxidantes se enlistan a continuación:

Catalasa: También conocida como peróxido dismutasa. Hemoproteína localizada principalmente en peroxisomas y mitocondria (citosol en los eritrocitos). Descompone al H₂O₂ en agua y oxígeno, utilizando hierro o manganeso como cofactores. Lo anterior involucra una oxidación divalente del hierro hemo a un catión radicalico de porfirina Fe(IV) por H₂O₂; seguida por su reducción divalente por una nueva molécula de H₂O₂ (Gupta, 2015; Venereo-Gutiérrez, 2002; Banerjee, 2008).



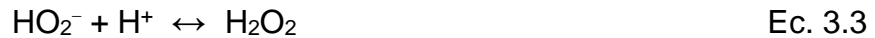
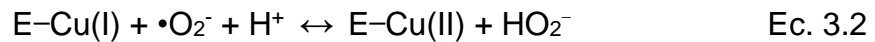
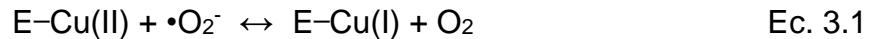


Ec. 2.2

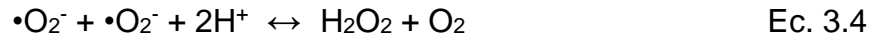
Superóxido dismutasa: (SOD) Cataliza la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ a O_2 y H_2O_2 . Este tipo de enzimas poseen en su sitio activo cationes metálicos redox-activos que actúan como intermediario, de manera que el metal acepta un electrón de un $\bullet\text{O}_2^-$ y lo dona a otro $\bullet\text{O}_2^-$, logrando así la dismutación sin que exista interacción directa entre ambos radicales (ecuaciones 3.1 a 3.4). Estos cationes pueden ser Cu(II), Mn(III), Fe(III) o Ni(II), los cuales son excelentes catalizadores de la dismutación de $\bullet\text{O}_2^-$ per se, sin embargo, como iones libres catalizan oxidaciones que pueden resultar peligrosas para el organismo vivo. Las SOD contienen al metal y maximizan su habilidad para catalizar esta dismutación, previniendo reacciones secundarias no deseadas. A su vez, por impedimento estérico, no permiten el acceso de moléculas mayores que el $\bullet\text{O}_2^-$ o HO_2^- al metal catalizador, minimizando estas reacciones secundarias. Debido a que $\bullet\text{O}_2^-$ es un anión monovalente, las SOD también le proveen una guía electrostática con residuos aminoacídicos cargados estratégicamente situados en su estructura (Banerjee, 2008; Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012).

- CuZnSOD. Enzima homodimérica poseedora de un Cu(II) y un Zn(II) por subunidad. Utiliza al cobre como catalizador, mientras que el zinc cumple funciones estructurales y de facilitador. Se encuentra en citosol y diversos organelos de células eucariotas; en mitocondria, se localiza en el espacio intermembranal.
- EcSOD. Una CuZnSOD de configuración extracelular que se une a glucosaminoglicanos. Molécula homotetramérica, glucosilada, y más grande que la CuZnSOD intracelular.
- MnSOD. Homotetrámero que utiliza manganeso como catalizador. Se encuentra en la matriz mitocondrial de plantas y animales.
- FeSOD. Encontrada en plantas y bacterias.
- NiSOD. Homotetrámero portador de níquel encontrada en *Streptomyces*. No exhibe homología de secuencia aminoacídica con otras SOD.

A continuación, se presenta el mecanismo de acción sugerido para CuZnSOD, donde 'E' denota a la enzima:



Sumatoria:



Glutación peroxidasa (GPx o GSH-px): GPx1 es una selenoproteína expresada en todos los tejidos de mamífero. Es un homotetrámero que contiene un residuo de selenocisteína por cada subunidad en el sitio activo, mediante el cual cataliza la reducción de H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos (Figura 7). En humanos existen otras cuatro isoformas: GPx2 gastrointestinal y pulmonar, GPx3 en glándulas tiroideas y riñones, GPx4 (GPx fosfolípido-hidroperóxido; PHGPx), y GPx6 en epitelio olfativo (Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012; Venereo-Gutiérrez, 2002).

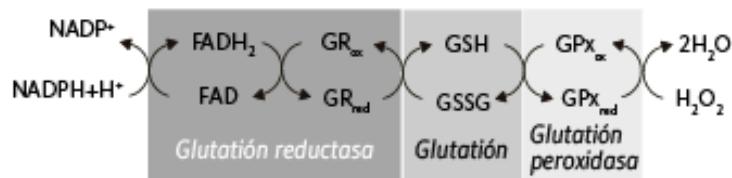


Figura 7. Las GPx catalizan la conversión de H₂O₂ a agua como resultado de la transferencia de electrones de NADPH a GPx a través de la glutación reductasa (GR) y GSH. Tomada del sitio en línea del Centro de Información de Micronutrientes, Instituto Linus Pauling de la Universidad Estatal de Oregon.

3.5. Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedades.

El gremio científico ha adoptado la teoría, originada en 1954 por Denham Harman, de que el declive de la funcionalidad de los sistemas orgánicos relacionado con la senectud se debe al acumulamiento progresivo e irreversible de daño oxidativo, generado por la interacción de RL producidos en el organismo con diversos constituyentes celulares:

Teoría del envejecimiento por radicales libres.

Ahondando su teoría, basado en numerosos estudios, Harman (2006) afirma que el envejecimiento se expresa por la suma del daño oxidativo por un proceso de envejecimiento innato, y aquel daño asociado a condiciones de vida subóptimas, es decir, factores ambientales y hábitos personales; gran parte de la concentración de daño ocurre a estructuras internas de la mitocondria, y es ocasionado mayormente por $\bullet\text{O}_2$; las mutaciones en ADN mitocondrial por RL están íntimamente asociadas a disminución de la esperanza de vida; medidas contra la iniciación o propagación de reacciones en cadena de RL disminuyen la tasa de envejecimiento y patogénesis; la formación de ATP disminuye con la edad a causa del daño oxidativo a estructuras mitocondriales y, por consecuencia, puede disminuir la síntesis reductora de antioxidantes como glutatión y cofactor NADPH. Se ha propuesto que, el crecimiento en la tasa de producción de ERO, así como un aumento en la susceptibilidad de los tejidos al daño oxidativo, ambos asociados a la edad, promueven que los niveles de estrés y daño oxidativos se eleven de manera exponencial durante el envejecimiento, describiendo un efecto de “bola de nieve” (Sohal y Weindruch, 1996).

Sohal y Weindruch (1996) han reunido datos de numerosos autores en los que se establecen relaciones directas entre edad y aumento *in vivo* de niveles de estrés oxidativo, indicadas por diversos parámetros moleculares en mamíferos. Tal es el aumento exponencial en alcanos exhalados (observado por Sagai e Ichinose en 1980) como producto de la peroxidación de lípidos de membrana; la elevación exponencial en concentración de proteínas oxidadas; aumentos en la concentración de 8-hidroxideoxiguanosina en el ADN de diversos tejidos, principalmente mitocondrial (Agarwal y Sohal, 1994).

Esta acumulación mencionada de daño oxidativo a las diversas biomoléculas, así como el estrés oxidativo, promueven alteraciones estructurales y funcionales en todo tipo de tejidos, órganos o sistemas, por lo que Venereo-Gutiérrez (2002) lo describe como un “mecanismo general de daño celular”, asociado con la fisiopatología primaria o evolución, génesis y consecuencias de una incontable cantidad de enfermedades.

Oxidación de carbohidratos.

En condiciones de estrés oxidativo, la glucosa, α -hidroxialdehídos y otros monosacáridos reductores, son propensos a sufrir autooxidación no enzimática (catalizada por metales) a cetoaldehídos, generando H_2O_2 , $\bullet OH$ y otros intermediarios reactivos, y promoviendo la glicación proteica, lo que consecuentemente genera cambios en las cargas de la superficie de esas proteínas, en su capacidad para unir hidrógeno, reconocimiento celular, al igual que inactivación enzimática y formación de complejos capaces de formar entrecruzamientos; este proceso se propone como una de las causas de daño tisular en diabetes, así como íntimo participante en envejecimiento y desórdenes metabólicos (Hunt et al., 1988; Semchyshyn et al., 2011). Por otro lado, los desoxiazúcares son atacados por RL, formando radicales centrados en carbono que se unen fácilmente a otros carbohidratos, despertando reacciones autocatalíticas en cadena que concluyen en destrucción celular y formación de cetoaminas y cetoaldehídos como productos finales (Noori, 2012).

Oxidación de lípidos.

La peroxidación lipídica es el proceso que causa el mayor daño oxidativo entre las biomoléculas debido a la facilidad con que reaccionan y se propagan los RL. Las ERO atacan a los ácidos grasos poliinsaturados, comúnmente adheridos a membranas como fosfolípidos, removiendo un átomo de hidrógeno para formar radicales alquilo, los que a su vez se rearreglan para formar dienos conjugados y posteriormente radicales peroxilo, los cuales desencadenan la cascada autocatalítica. La cadena se fragmenta para formar alcanos tóxicos (pentano, etano) y aldehídos de ácidos grasos α o β insaturados, principalmente malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal (Venereo-Gutiérrez, 2002; Noori, 2012, Bochkov et al., 2010). Estos productos, tanto intermedios como terminales, se han visto involucrados en fibrosis, lupus eritematoso sistémico, formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, diversas enfermedades inflamatorias (aterosclerosis, diabetes, artritis reumatoide, etc.), infarto agudo al miocardio y algunas condiciones neurodegenerativas, como la de Alzheimer y la de Parkinson (Egea et al., 2017; Greig et al., 2012).

Por otro lado, los productos de oxidación de fosfolípidos también poseen propiedades antiinflamatorias en concentraciones bajas: por inhibición de la síntesis de óxido nítrico en macrófagos, por activación de los receptores de proliferación de peroxisomas, atenuando la activación y maduración de células dendríticas, inhibiendo la proliferación y citotoxicidad de los linfocitos T, por inhibición selectiva de algunas proteínas en la familia de receptores tipo toll, regulación de enzimas antioxidantes, entre otras vías involucradas (Egea et al., 2017; Greig et al., 2012).

Oxidación de proteínas.

La oxidación a estructuras proteicas es principalmente atribuida a $\bullet\text{OH}$, pero determinada por las concentraciones existentes de O_2 , $\bullet\text{O}_2^-$, o $\text{HO}_2\bullet$. Las interacciones con estas ERO causan oxidación de cadenas laterales de aminoácidos, entrecruzamientos de cadenas peptídicas y oxidaciones directas en la espina dorsal de la cadena, promoviendo la fragmentación de la proteína (Berlett y Stadtman, 1997; Venereo-Gutiérrez, 2002), así como alteraciones en las cargas eléctricas de los péptidos (Noori, 2012). Especies reactivas de nitrógeno, como el peroxinitrito y algunos de sus derivados, atacan a los residuos de metionina y cisteína, y participan en la nitración de tirosina y triptófano, causando fragmentación proteica (Berlett y Stadtman, 1997; Noori, 2012). Las rupturas de cadena pueden dar lugar a la formación de grupos carbonilo, ya sea por reacción con ERO, con aldehídos resultantes de la oxidación de lípidos, con derivados reactivos de carbonilos resultantes de la oxidación de carbohidratos (glicación y glicoxidación), o debido a oxidaciones catalizadas por metales (Berlett y Stadtman, 1997; Noori, 2012).

Berlett y Stadtman (1997) asocian al proceso de envejecimiento con acumulación de enzimas menos activas, o inactivas, y más termolábiles, y señalan cómo esto puede ser atribuido parcialmente al estrés oxidativo basados en la evidencia reunida de numerosos estudios experimentales. En ellos se documentan cambios, similares a los que ocurren durante el envejecimiento, principalmente en la actividad enzimática, estructura química y susceptibilidad proteolítica como resultado de la exposición de estas estructuras, tanto *in vitro* como *in vivo*, a ERO o a condiciones de estrés oxidativo. El grado de acumulación de estas proteínas oxidadas está regido por dos factores: la concentración y actividad de

las moléculas antioxidantes; y la concentración y actividad de las proteasas encargadas de la degradación de estas proteínas modificadas por daño oxidativo.

La acumulación de proteínas oxidadas y de los aductos que forman con los productos de la oxidación de lípidos y carbohidratos se ha visto asociada con incontables patologías de diversos tipos, entre las que se encuentran progeria, artritis reumatoide, cataratas, distrofia muscular, esclerosis lateral amiotrófica, aterosclerosis, síndrome de distrés respiratorio, enfermedad de Alzheimer (Mayor-Oxilia, 2010), diabetes, enfermedad de Parkinson, fibrosis quística, colitis ulcerosa, hipertensión (Berlett y Stadtman, 1997).

Oxidación de ADN.

En condiciones normales las ERON desempeñan un rol de señalización involucrado en la diferenciación y auto renovación de células madre (Bigarella et al., 2014), así como en la regulación de la expresión génica y estabilidad genómica. Estos procesos se efectúan mediante regulación de diversos factores de transcripción, de la estabilidad del ARNm y del daño y reparación del ADN por parte de las ERON. De igual forma, estas moléculas reactivas actúan sobre la expresión y funciones de enzimas modificadoras de ADN e histonas, desencadenando mecanismos epigenéticos (Mikhed et al., 2015; Egea et al., 2017).

En condiciones de estrés oxidativo, las ERON degradan a los azúcares y bases nitrogenadas del ADN, causando modificaciones oxidativas en las bases que las vuelven propensas a uniones cruzadas con proteínas y malondialdehído, al igual que a desmetilación de citosinas indispensables en la activación de genes; fragmentan las cadenas de ADN, ocasionando la formación de aductos, deleciones, mutaciones y reordenamientos cromosómicos (Venereo-Gutiérrez, 2002; Noori, 2012; Cadet et al., 2005).

Estos cambios a la estructura de los ácidos nucleicos, así como una consecuente regulación inefectiva de procesos epigenéticos por parte de las ERON, tienen efectos en la expresión génica asociados con muerte celular, mutagénesis, carcinogénesis (por

inactivación o pérdida de genes supresores de tumores) y envejecimiento, desencadenando diversos tipos de patologías (Cadet et al., 2005).

Las ERON se ven involucradas en procesos de fibrogénesis por estimulación o degradación de diversos tipos de microARN's; promueven sobreexpresión de las diversas NADPH oxidasas, participando en enfermedad cardiovascular, fibrosis, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, entre otras patologías asociadas con la edad; el ADN oxidado por las ERON (así como la lipoperoxidación y la activación de metaloproteinasas de matriz) también promueve la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, asociado a muerte celular en cardiomiopatías isquémicas y a desórdenes en el metabolismo de energético de la mitocondria (Egea et al., 2017; Noori, 2012).

En general, las ERON promueven la respuesta inflamatoria por regulación positiva de quimiocinas y moléculas de adhesión (Egea et al., 2017); se han observado niveles elevados de ERON durante el desarrollo de distintos tipos de cáncer como en boca, vías aéreas superiores, pulmón, tubo digestivo, próstata y aparato genital femenino (Mayor-Oxilia, 2010), participantes en procesos de angiogénesis (Elejalde-Guerra, 2001); implicadas en enfermedades neurodegenerativas por la formación de nitrotirosina a partir de peroxinitrito en células gliales (Noori, 2012); involucradas en la iniciación y extensión de lesiones ateroscleróticas vía alteración o fragmentación de lipoproteínas de baja densidad, resultando en moléculas con mayor captación por parte de los macrófagos, citotóxicas para el endotelio, y estimuladoras de factores vasoactivos de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas (Elejalde-Guerra, 2001); en el cristalino, producen degradación y entrecruzamiento de proteínas, que se acumulan para opacificar el medio formando una catarata (Elejalde-Guerra, 2001); en asma, las ERON, provenientes tanto de factores ambientales (contaminación, tabaquismo) como de células proinflamatorias, son causantes de apoptosis de células epiteliales en tracto respiratorio, así como de daño estructural y funcional a mitocondrias, exacerbando la inflamación de la vía aérea por alteraciones en los procesos de presentación antigénica y generación de respuesta inmune por parte de la mitocondria, que a su vez lo vuelve un estado crónico (Reddy, 2011); en el sistema cardiovascular las ERON también participan en procesos proinflamatorios; $\bullet\text{O}_2^-$ reacciona fácilmente con óxido nítrico (NO), disminuyendo la

capacidad de dilatación vascular y la señalización normal mediada por NO; promueven reducciones en el flujo sanguíneo en reposo, disfunción celular por activación de poli (ADP-ribosa) polimerasas, así como daños a la estructura vascular y a la matriz extracelular por activación de metaloproteinasas principalmente (Chen et al., 2012); la enfermedad renal terminal cursa con un estado microinflamatorio constante asociado al aumento de estrés oxidativo debido a la uremia característica de esta patología, de manera que las ERON participan ampliamente en el desarrollo de las principales complicaciones de dicha enfermedad (Locatelli et al., 2003).

3.6. Relación de fármacos con desarrollo de estrés oxidativo.

La terapéutica tiene entre sus objetos de estudio la utilización de fármacos en el tratamiento y prevención de enfermedades, analizando para ello sus propiedades fisicoquímicas y la naturaleza de su actividad biológica, de las que derivan su eficacia y su seguridad clínica.

Ya sean sintéticas, naturales o endógenas, la utilización de sustancias en el organismo con fines terapéuticos puede provocar efectos secundarios, es decir, respuestas o efectos distintos al que se busca con el tratamiento. Estos efectos pueden ser perjudiciales o beneficiosos, reversibles o irreversibles, de aparición inmediata o retardada, súbita o paulatina. Su aparición puede asociarse a distintos factores, como la dosis del fármaco, su vía de administración, duración del tratamiento, así como a cuestiones idiosincráticas del paciente, a una suspensión súbita del tratamiento o la interacción de un fármaco con otros administrados de manera simultánea. Estos efectos son atribuidos a la interacción entre el fármaco y las diversas biomoléculas existentes en el organismo, ya sea con la molécula diana del tratamiento u otras distintas por las que pueda presentar afinidad el mismo fármaco, o bien, interacciones de dicho fármaco de estructura original inalterada o de sus metabolitos generados en el organismo durante el curso del tratamiento. Es una tarea incesante para la comunidad científica la de investigar y dilucidar los mecanismos por los que se generan los efectos secundarios con el fin de aprender a manejarlos; evitar, disminuir o contrarrestar los efectos perjudiciales o adversos, o estudiar aquellos efectos secundarios benéficos para el diseño de nuevos esquemas de tratamiento. Dentro de una larga lista de efectos secundarios podemos

encontrar la formación de RL y otras especies químicas reactivas que interactúan con las distintas moléculas que integran a los organismos vivos, proceso mediado por reacciones de óxido-reducción (redox) desarrolladas en diversos tipos de tejido.

Se reporta en la literatura evidencia de la contribución del estrés oxidativo inducido por fármacos a mecanismos de toxicidad en diversos tejidos, tales como hígado, riñón, oído, ojo, sistemas cardiovascular y nervioso, sin poder llegar a esclarecer los mecanismos por los que esto ocurre en la mayor parte de los casos. Sin embargo, se ha logrado señalar la medida en que especies pro-oxidantes y diversos marcadores de daño por estrés oxidativo aumentan sus niveles en suero y distintos tipos de tejido durante el desarrollo de algunas toxicidades, tanto en humanos como en animales. Asimismo, se han generado datos que muestran reducciones en los niveles de moléculas antioxidantes, así como disminución en concentraciones y actividad de las enzimas que forman parte de las defensas contra el daño oxidativo; algunas enzimas también pueden encontrarse sobreexpresadas o en alta actividad por mecanismos adaptativos contra excesos de agentes prooxidantes (Deavall et al., 2012; Uzar et al., 2012; Gómez-Oliván et al., 2014).

Moléculas con distintos mecanismos de acción son capaces de producir diversos tipos de toxicidad con los que se asocia íntimamente al estrés oxidativo. Entre los diversos tipos de fármacos reportados podemos encontrar algunos casos de antitumorales, antiinflamatorios no esteroideos, antirretrovirales, antihipertensivos, antibióticos, antiepilépticos, antiscótics y analgésicos (Chandran et al., 2014; Ozbek, 2012; Ficarra et al., 2013; Deavall et al., 2012; Saraswathy et al., 2012).

Algunos ejemplos de lo anterior podrían ser los expuestos por Deavall y sus colaboradores (2012), quienes describen cómo la doxorubicina (antineoplásico) es causante de diversas cardiomiopatías por procesos oxidativos; mediante procesos metabólicos oxidativos, las antraciclinas se transforman a radicales libres que, en condiciones aerobias, reducen el oxígeno formando ERO, las cuales causarían perturbaciones, disfunciones y hasta muerte celular; estas investigaciones también denotan cómo la azidotimidina (antirretroviral) genera cardiotoxicidad y patologías de músculo esquelético debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno,

atribuibles principalmente a la fracción 'azido' de la molécula; reportan que el cisplatino ha sido causante de ototoxicidad, neuropatía periférica y nefrotoxicidad. Se asocian niveles residuales de platino en el organismo con la producción de aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

3.7. Hidroxicloroquina.

La hidroxicloroquina es un fármaco del grupo de las 4-aminoquinolinas, uno de los derivados sintéticos más avanzados de la quinina, y el de preferencia por ser más efectivo y seguro que otros de este grupo. Es un compuesto organoclorado, que a su vez posee un grupo amino terciario y dos aminos secundarios en su estructura (Figura 8), los cuales presentan valores de pKa de 9.67, 8.27 y <4.0, lo que le confieren un carácter básico, presumiblemente el principal responsable de sus efectos farmacológicos (Chat Ham, 1989; Lim et al., 2009; De Moura Ferraz et al., 2014; Schroeder y Gerber, 2014; Rainsford et al., 2015; Collins, Jackson y Gustafson, 2018).

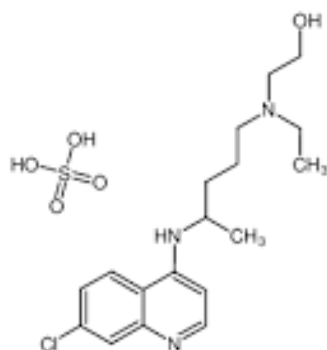


Figura 8. Sulfato de Hidroxicloroquina.

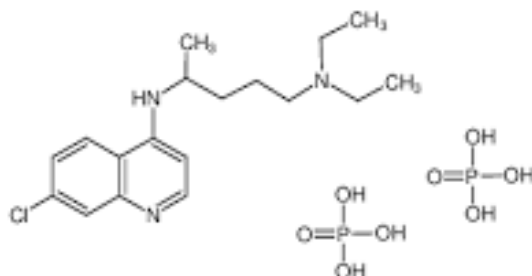


Figura 9. Difosfato de Cloroquina.

Posee gran actividad contra las formas eritrocitarias de *Plasmodium vivax* y *P. malariae*, así como contra la mayoría de las cepas de *P. falciparum* en fase no gametocítica (Lim et al., 2009; De Moura Ferraz et al., 2014); tiene grandes efectos inmunomoduladores, por lo que se utiliza ampliamente en enfermedades autoinmunes, reumatológicas y diversas enfermedades de la piel, entre estos grupos se enlistan: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjögren, reumatismo palindrómico, fascitis eosinofílica, síndrome anticuerpo antifosfolípido, porfiria cutánea tarda, erupción polimorfa lumínica, granuloma anular, lupus discoide, entre muchas otras (Rynes, 1997; Restrepo, 2006; Ben-Zvi et al., 2012; Rodriguez-Caruncho y Bielsa-Marsol, 2012; Hage, Al-Badri y Azar, 2014; Rainsford et al., 2015; Danza et al., 2016); produce efectos hipoglucemiantes, mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye el aclaramiento de ésta (Emami et al., 1999; De Moura Ferraz et al., 2014; Hage, Al-Badri y Azar, 2014; Rainsford et al., 2015); actúa en infecciones virales y antimicrobianas, efectivo coadyuvante en el tratamiento contra VIH (Ben-Zvi et al., 2012; Rainsford et al., 2015); entre otros de sus efectos se enlistan: inhibición de la actividad de la histamina, inhibición de la fosfolipasa A₂, inhibición de liberación de enzimas lisosomales, disminución de agregación plaquetaria, efectos sobre modificaciones postraduccionales, disminución de sedimentación globular, efectos antiserotonina, efectos fotoprotectores, cardioprotección (antitrombótica, antiaterosclerótica), reducción de proliferación de linfocitos y producción de interleucinas, efectos contra autofagia y antineoplásicos en células cuya supervivencia depende de la autofagia, algunos tipos de linfoma, leucemia y tumores sólidos (Ben-Zvi et al., 2012; Rainsford et al., 2015; Floris et al., 2018).

Farmacocinética.

Este fármaco se administra de manera oral como sulfato de hidroxiclороquina, con el objeto de mejorar su solubilidad e interacción con algunos receptores membranales (De Moura Ferraz et al., 2014), en una mezcla racémica de dos enantiómeros, R y S, en proporción equimolar (Midha et al., 1996; De Moura Ferraz et al., 2014). Es absorbida rápidamente por difusión pasiva en tracto gastrointestinal alto tras una administración de 200 mg, alcanzado una biodisponibilidad de 70 a 80%, proceso que se ha visto afectado

por condiciones severas de desnutrición, no así por diarreas (Fust, 1996). Utilizando una dosis de 400 mg diarios de HCQ, correspondiente a la dosis usada en artritis reumatoide, se pueden alcanzar niveles terapéuticos al cabo de dos semanas de iniciado el tratamiento (Rynes, 1997), sin embargo, los efectos clínicos surgen en el estado estacionario de la concentración de este fármaco, alcanzado en un rango de 3 a 6 meses cuando no se administran dosis de carga (Browning, 2014).

Ha resultado de gran dificultad definir los parámetros farmacocinéticos que rigen a este fármaco, pues existe una amplia variabilidad entre datos recolectados por numerosos estudios experimentales asociada a las propiedades fisicoquímicas de la molécula, los procesos estereoselectivos del organismo hacia el fármaco, las variables proporciones en que se acumula la HCQ en los diversos tipos de líquidos, células y sus estructuras internas, cuestiones idiosincráticas o de farmacogenómica (Furst, 1996; De Moura Ferraz et al., 2014; Rainsford et al., 2015).

La mayor parte de los parámetros farmacocinéticos que rigen a la hidroxicloroquina son dependientes de la dosis y encajan en un modelo tricompartmental (Tabla 3; 200 mg de HCQ es la dosis generalmente administrada por duplicado diariamente en el tratamiento de la mayoría de las enfermedades reumáticas y autoinmunes para las que se indica). Una vez absorbida tiene una amplia distribución a compartimentos hidrosolubles, como plasma, líquido intersticial o músculo, con tendencia a concentrarse más en cerebro, pelo, piel, corazón, riñón, pulmón, hígado, bazo, así como en tejidos pigmentados del ojo, debido a su alta afinidad por la melanina en ellos; así, la concentración de HCQ en la epidermis puede volverse hasta 200 veces más grande que en el plasma, y en eritrocito hasta 5 veces mayor que en plasma (McChesney et al., 1965; De Moura Ferraz et al., 2014; Rainsford et al., 2015). La lipofilicidad de 3.84 $\log K_{ow}$ (muy liposoluble) de la HCQ permite su paso del plasma al citosol por difusión simple y, posteriormente, su distribución hacia diversas estructuras intracelulares, principalmente endosomas de pH ácido, como los lisosomas, donde se propone que ejerce principalmente su efecto (Fox, 1993; Sundelin y Terman, 2002; Jiménez-Palop, 2006; Ramser et al., 2009; Rodríguez-Caruncho y Bielsa-Marsol, 2012; Hage, Al-Badri y Azar, 2014; De Moura Ferraz et al., 2014; Rainsford et al., 2015). También se ha observado que la HCQ tiene paso a través

de la barrera placentaria durante la gestación, así como presenta excreción en leche materna; sin embargo, no existe evidencia de toxicidad fetal ni anomalías congénitas, ni evidencia que avale contraindicar este fármaco durante la lactancia (Rainsford et al., 2015; Ben-Zvi et al., 2012).

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos promedio para una administración oral de 200 mg de sulfato de HCQ, mezcla racémica.

Constante de absorción, k_a	0.069 – 0.362 h ⁻¹
Período de latencia de absorción	0 – 0.85 horas
Tiempo máximo de absorción, T_{max}	2 – 4.5 horas
Efecto de primer paso hepático	6%
Biodisponibilidad, F	74 ± 13%
Concentración máxima en plasma, $C_{max,plasma}$	34 - 79 ng/mL
Concentración máxima en plasma, $C_{max,ST}$	188 – 427 ng/mL
Volumen de distribución, V_d	44,257 L
Unión a proteínas plasmáticas	43 ± 10 %
Concentración plasmática en estado estacionario*	5.88 x10 ⁻⁷ M
Concentración en sangre total en estado estacionario*	2.94 x 10 ⁻⁶ M
Aclaramiento de sangre total, Cl_{ST}	96 ± 5 mL/min
Vida media de eliminación, $t_{1/2}$	50 ± 16 días
Aclaramiento del plasma, Cl_{plasma}	667 ± 235 mL/min
Tasa de aclaramiento renal para HCQ (con metabolitos)	40 – 50%
Tasa de aclaramiento renal para HCQ inalterada	21%
Tasa de aclaramiento por heces	8 – 25%
Tasa de aclaramiento a través de la piel	5%
Almacenamiento en tejido magro	25 - 45%

*Tras múltiples administraciones de 155 mg/día de HCQ (200 mg de sulfato de HCQ). El tiempo en alcanzar el estado estacionario varía en función de la dosis; en este caso, 6 meses para alcanzar 96% de niveles en estado estacionario. *Modificada de Rainsford et al., 2015*, con apoyo en las publicaciones de Tett et al., 1988; Tett et al., 1989; McLachlan, Cutler y Tett, 1993; Furst 1996; Midha et al, 1996; Lim et al., 2009; Browning, 2014; De Moura Ferraz et al., 2014; Floris et al., 2018.

En cuestiones de biotransformación, la HCQ es desalquilada en el hígado por acción del citocromo p450 (principalmente sus isoformas CYP2C8, CYP3A4 y CYP2D6, con ligera participación de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2D9) para formar tres principales metabolitos activos (actividad terapéutica y tóxica): desetil-hidroxicloroquina (DHCQ), desetil-cloroquina (DCQ) y bidesetil-cloroquina (BDCQ) (McLachlan, Cutler y Tett, 1993; Furst, 1996; Lim et al., 2009; Rainsford et al., 2015). Al cabo de 4.7 horas (promedio) de la administración vía oral de una dosis de 200 mg de sulfato de HCQ, Tett y sus colaboradores (1989) observaron concentraciones máximas de DHCQ de 6.9 a 17 ng/mL, y picos de concentración de DCQ entre 2.9 y 18.2 ng/mL alcanzando las 5.2 horas (promedio).

Este fármaco es excretado por vía renal en un 40 a 50%, eliminándose en su forma inalterada en un 21 a 47% (Furst, 1996), mientras que el 8 – 25% se elimina en las heces y el 5% a través de la piel (Browning, 2014). Hasta un 45% de la porción absorbida se almacena en tejido magro por tiempos prolongados, causando que la HCQ alcance una vida media de eliminación de alrededor de 50 días (Furst, 1996; Browning, 2014).

Farmacodinamia.

La HCQ es una molécula lisosomotrópica, es decir, tiene la propiedad de difundir fácil y rápidamente a través de las membranas para acumularse en lisosomas y otras estructuras intracelulares acídicas y afectar sus funciones, siendo éste el principal mecanismo por el que ejerce sus acciones farmacológicas. Esta acumulación se debe a que la molécula de HCQ es protonada, quedando atrapada en el medio ácido (los lisosomas poseen un pH de 4 a 5), pues no puede difundir de vuelta al citoplasma en su especie ionizada. Al protonar el fármaco, el pH del endosoma se eleva (a alrededor de 6), impidiendo que se lleven a cabo reacciones de hidrólisis ácida (inhibición proteolítica) y reacciones enzimáticas diversas, a la vez que genera modificaciones en la estructura interna de los endosomas, afectando la secreción de enzimas lisosomales destructoras de tejido y numerosas proteínas provenientes de otros organelos; la HCQ modifica la codificación de proteínas en el aparato de Golgi afectando procesos como la autofagia, glucosilación, entre otras funciones pH-dependientes, ya sea de forma parcial o total. Como consecuencia de esta disfunción lisosomal, linfocitos y neutrófilos forman nuevos

lisosomas anormales, frecuentemente con actividad autofágica descontrolada, esto induce apoptosis en estas células sanguíneas, al igual que en células endoteliales, además de impedir la señalización de linfocitos T dependiente de calcio disminuyendo su proliferación y actividad (Homewood et al., 1972; Sundelin y Terman, 2002; Willis et al., 2012; Browning, 2014; Rainsford et al., 2015; Rezabakhsh et al., 2017).

Las especies de *Plasmodium* en etapa eritrocítica poseen vacuolas digestivas de estructura similar a los lisosomas de mamíferos y con un pH interno ácido, cuya función es la degradación de hemoglobina del huésped para obtención de nutrientes. Las propiedades de estos endosomas permiten a la HCQ difundir fácilmente y acumularse en ellas, lo que tendría como resultado un aumento en el pH de la vacuola, afectando al metabolismo de fosfolípidos, así como al proceso de degradación de hemoglobina, disminuyendo así la obtención de aminoácidos por el parásito; inhibiendo de esta forma la etapa eritrocítica y la esquizogonia de especies no resistentes de *Plasmodium*. A su vez, ante la imposibilidad de recolectar nutrientes para su supervivencia, algunas especies de *Plasmodium* pueden llegar a desarrollar autofagosomas y promover su propia destrucción (Homewood et al., 1972; Slater y Cerami, 1992).

El grupo 'hemo', derivado de la degradación de hemoglobina dentro de las vacuolas digestivas de *Plasmodium*, resulta un componente tóxico en el interior de estos endosomas debido a su capacidad para generar estrés oxidativo y promover daño a membranas biológicas e inhibición enzimática. Slater y Cerami (1992) explican la existencia de una enzima hemo-polimerasa que, para evitar degradar o excretar 'hemo' y poder aprovechar sus componentes, se encarga de detoxificar los grupos 'hemo' libres, formando cadenas poliméricas con éstos mediante la unión del ion férrico central de un 'hemo' con el oxígeno de la cadena lateral carboxilada del siguiente (estructura llamada hemozoina). El proceso de detoxificación se ve afectado por antimaláricos como cloroquina (CQ, análogo estructural de la HCQ cuya diferencia radica sólo en un grupo hidroxilo en la cadena lateral) y HCQ por inhibición de esta hemo-polimerasa, así como por disminución del glutatión reducido disponible en la vacuola, promoviendo así autooxidación, estrés oxidativo y muerte del parásito (Toler, Noe y Sharma, 2006).

Un pH bajo, como el de los lisosomas, es requerido para la degradación de proteínas antigénicas a péptidos para su reconocimiento y presentación. Una vez formados, estos péptidos se unen al Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (CMH-II) en sus porciones α y β para formar nuevos complejos α - β -péptido, los cuales serán movilizados hacia la membrana celular para ser presentados a las células T CD4⁺ (Fox, 1993; Browning, 2014; Rainsford, 2015). Los péptidos generados compiten por el sitio de unión con las cadenas invariantes (Ii), que se encuentran unidas al CMH desde su formación, desplazándolas fácilmente cuando se trata de péptidos de alta afinidad. Con el aumento del pH se estabiliza la unión de α y β con las cadenas Ii, de manera que péptidos con baja afinidad por el CMH-II no pueden desplazar a Ii para formar complejos de presentación (Fox, 1993; Rainsford, 2015). Por lo general, los autoantígenos poseen baja afinidad por el CMH-II, lo que dificulta que puedan ser presentados en concentración suficiente en la membrana del macrófago bajo los efectos de la HCQ, a diferencia de los antígenos exógenos, que comúnmente poseen alta afinidad por CMH-II; esto ocasiona que se vea disminuida la producción de células T CD4⁺ contra autoantígenos y liberación de citocinas. De esta forma, HCQ disminuye procesos autoinmunes sin afectar de manera significativa las respuestas contra antígenos exógenos (Fox, 1993; Browning, 2014; Rainsford, 2015).

Entre las funciones pH-dependientes que se ven afectadas por el uso de HCQ se encuentran: la degradación proteolítica por inhibición de diversas enzimas, involucradas en fagocitosis y diversos procesos fisiológicos de la célula; la quimiotaxis leucocitaria y la producción de diversas citocinas, actuando sobre su ARNm a nivel transcripcional, entre ellas IL-1, IL-6, IL-2, IL-17, IL-22, IFN- α , IFN- γ y TNF- α , lo que le confiere a este fármaco propiedades antiinflamatorias (mecanismo de mayor impacto en artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico), y además promueve un aumento en la sensibilidad a insulina; la metilación de fosfolípidos y la fosfolipasa A2, afectando la liberación de histamina en mastocitos y la formación de prostaglandinas, particularmente PGF₂, y leucotrienos; la síntesis de proteínas de fase aguda, así como su estimulación debido a la disminución de la producción de citocinas (Miyachi et al., 1986; Wallace et al., 2012; Ben-Zvi et al., 2012; Danza et al., 2016).

Mediante su mecanismo de elevación del pH lisosomal, la HCQ es capaz de impedir la transformación de los receptores tipo Toll (TLR, Toll like receptors) TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 para su activación, disminuyendo la producción de IFN- γ , IL6 y TNF- α por interrupción de esta vía de señalización (los TLR se unen a ácidos nucleicos para promover producción de autoanticuerpos y mediadores de inflamación), mermando la generación consecuente de ERON. Otra forma en que la HCQ evita la activación de TLR es uniéndose a los ácidos nucleicos y enmascarando su epítipo de unión a estos receptores. Por otro lado, la HCQ no interfiere con la expresión de estos receptores. De igual forma, la HCQ puede reducir la expresión y concentración de estas y otras citocinas como IL17 e IL22 por mecanismos epigenéticos. La disminución en la producción de estas citocinas afecta a la activación de las células B y a la producción de autoanticuerpos; también favorece la diferenciación de células endoteliales (Kuznik et al., 2011; Gómez-Guzmán et al., 2014; Rezabakhsh et al., 2017; Floris et al., 2018). Al inhibir la interacción entre TLR y ácidos nucleicos la HCQ también provoca disminución en la producción de factor reumatoide y otras moléculas inflamatorias causantes de daño a tejidos que participan en múltiples enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (Danza et al., 2016).

HCQ ha probado efectividad para mejorar la función endotelial en modelos murinos de lupus eritematoso sistémico, principalmente por reducción de la actividad de NADPH oxidasa y de la expresión génica que las subunidades NOX-1 y p47^{phox} (Gómez-Guzmán et al., 2014; Rahman et al., 2016; Floris et al., 2018). Al disminuir la producción del anión superóxido por esta enzima, se reduce el daño oxidativo directo al endotelio, al tiempo que impide el secuestro de NO para formar especies reactivas de nitrógeno, permitiendo mejorar la relajación dependiente de endotelio (Viridis et al., 2015). Otro mecanismo por el que la HCQ mejora la función endotelial es reduciendo la liberación de endotelina-1 por efecto del TNF- α o en pacientes con preeclampsia (Rahman et al., 2016). Debido a su efecto inhibitorio de la liberación de TNF- α , la HCQ disminuye el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas en pacientes de artritis reumatoide (Hartman et al., 2016).

En estos modelos también se ha observado que HCQ confiere protección contra la nefritis lúpica: la reducción de la actividad de NADPH oxidasa promueve disminución de la presión sanguínea sistólica y, consecuentemente, de hipertrofias y lesiones morfológicas en riñón, reflejada en disminución de la proteinuria; en lupus eritematoso sistémico existe aumento de diversos tipos de linfocitos T, cuyo infiltrado al riñón es de carácter común, de manera que HCQ actúa reduciendo la proliferación de células T reguladoras y Th-17, evitando así el daño que provocan al tejido renal (Gómez-Guzmán et al., 2014).

La HCQ ha demostrado tener actividad antitrombótica. Müller-Calleja y sus colaboradores (2017) observaron que interfiere con el ensamblaje de NOX2 afectando su señalización proinflamatoria y vías protrombóticas activadas en algunas enfermedades autoinmunes. El tratamiento con antimaláricos se ha visto asociado a disminución de niveles de fibronectina y fibrinógeno en modelos animales de inflamación (Fox, 1993). Se ha probado que HCQ inactiva a la fosfolipasa A2, inhibiendo la producción de tromboxano A2 y prostaglandinas en las plaquetas estimuladas; así mismo, inhibe la agregación intravascular de eritrocitos en forma de pila de monedas (Jiménez-Palop, 2006; Ben-Zvi et al., 2012). Se ha observado que HCQ reduce la actividad de los anticuerpos IgG antifosfolípidos (AAF): disminuye la activación plaquetaria, al igual que la liberación de gránulos alfa; reduce la interferencia de los AAF con la actividad de la anexina A5 (proteína anticoagulante vascular y placentaria); en un modelo de ratones inyectados con AAF humanos (Edwards et al., 1997), HCQ demostró disminuir el tiempo de formación y tamaño del trombo, al igual que el tiempo de lisis del mismo; además HCQ promueve la disociación de los AAF y la bicapa fosfolipídica, disminuyendo así el riesgo de formación de placa aterosclerótica (Jiménez-Palop, 2006; Ben-Zvi et al., 2012; Danza et al., 2016; Floris et al., 2018).

Hage y sus colaboradores (2014) presentaron un caso clínico y una recopilación de datos bibliográficos en los que se ha observado que la HCQ presenta efectos benéficos en el metabolismo de glucosa y lípidos. Exponen estudios en los que la HCQ ha demostrado disminuir la concentración sérica de la glucosa, el porcentaje de HbA1C y los requerimientos de insulina en pacientes diabéticos y en pacientes con obesidad o enfermedades inflamatorias crónicas sin diabetes. En esos datos también se menciona

que la HCQ ha disminuido el metabolismo de la insulina, ha aumentado la sensibilidad a insulina e incluso ha disminuido el riesgo de desarrollar diabetes mellitus. En esta recopilación se reporta reducción en los niveles séricos de colesterol-LDL, colesterol total, triglicéridos y apolipoproteína CIII, así como aumento de colesterol-HDL en pacientes con enfermedades reumáticas. Estos datos han sido respaldados por el trabajo de Hartman y su equipo (2016).

Los antimaláricos poseen actividad atribuida a la elevación del pH de organelos acídicos en células infectadas. Se ha observado que tienen la capacidad de inhibir los mecanismos de entrada de algunos virus a células humanas, así como la glucosilación de proteínas virales, evitando su replicación y propagación; tales son los casos de coronavirus y VIH. HCQ inhibe a la glucoproteína 120 que se encuentra en la superficie de la envoltura del VIH, impidiendo su glucosilación a nivel postraducciona, esto origina nuevas partículas virales sin capacidad de unión a los receptores CD4 en las células, principalmente linfocitos T, por lo que no ocurre fusión de membranas ni entrada del virus a la célula (Ben-Zvi et al., 2012; De Moura Ferraz et al., 2014).

La hidroxiclороquina también posee actividad antineoplásica, en parte atribuida a su capacidad de inhibición de la autofagia, herramienta indispensable para algunos tipos de tumor para adaptarse y sobrevivir a los tratamientos y al propio microambiente agresivo del tumor, principalmente aquellos que crecen en regiones poco vascularizadas, con reducido aporte de nutrientes y en condiciones de hipoxia (Manic et al., 2014; Rezabakhsh et al., 2017). La autofagia permite la eliminación de los productos de degradación de la célula, eliminando especies potencialmente citotóxicas como las ERON, asegura la integridad mitocondrial y le proporciona sustratos a ésta para mantener sus rutas metabólicas (Manic et al., 2014; Rezabakhsh et al., 2017); tumores en diversos tejidos requieren de una actividad autofágica eficiente para su proliferación (Choi et al., 2014; Manic et al., 2014); la autofagia se considera un factor indispensable en la auto renovación de las células madre cancerosas (Choi et al., 2014). Esta inhibición se logra mediante la alcalinización de los lisosomas, lo que impide su fusión con los autofagosomas, ocasionando acumulación de autofagosomas inefectivos y productos anormales de su actividad metabólica, que resultan en muerte de la célula tumoral; de

igual forma, la inhibición de la autofagia disminuye la proliferación de diversos tipos de células cancerosas, y afecta de manera significativa la auto renovación y supervivencia de las células madre cancerosas. Se postula que por este mecanismo la HCQ provoca la sensibilización del tumor a agentes anticancerígenos, aumentando su efectividad terapéutica (Manic et al., 2014; Rezabakhsh et al., 2017; Collins, Jackson y Gustafson, 2018); Choi y sus colaboradores (2014) sugieren que la cloroquina ataca a células madre cancerosas por inhibición de la autofagia, potenciando los efectos antitumorales del Paclitaxel sobre cáncer de mama triple negativo, y reportaron que ambos fármacos en combinación ocasionaron reducciones en el tamaño de los tumores, inhibición de su crecimiento, regresión total en algunos casos, significativa disminución de metástasis a pulmón, así como también fueron capaces de retardar la reaparición del tumor, y en algunos casos evitarla.

Por otra parte, la actividad antineoplásica de HCQ también se expresa mediante su efecto, ya sea positivo o negativo, sobre diversas vías de señalización dentro y fuera de las células tumorales. Choi y sus colaboradores (2014) llevaron a cabo diversos ensayos sobre la actividad de la cloroquina sobre células madre cancerosas, en donde reportaron que la CQ reduce este tipo de células mediante regulación epigenética, presentando mayor efecto en combinación con Paclitaxel: inhibe la vía de Jak2/STAT3 mediante disminución de la fosforilación de ambas moléculas y una baja en la expresión de Jak2; inhibe la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR; reduce la expresión de ADN metiltransferasa 1, afectando múltiples otras vías de señalización por disminución de la metilación de ADN, como la sobreexpresión de proteínas supresoras de la señalización de citocinas SOCS1 y SOCS3. Boya y sus colaboradores (2003) describieron una secuencia estricta de eventos por la cual la HCQ induce muerte celular debido a su actividad lisosomotrópica: la HCQ se acumula en los lisosomas disminuyendo su gradiente de pH, ocasionando así permeabilización de la membrana lisosomal y liberación de catepsina B; activa a la proteína Bax y su inserción en las membranas mitocondriales, generando pérdida de su potencial transmembranal (permeabilización de membrana mitocondrial) y liberación de citocromo c; activación de caspasa 3, exposición

de fosfatidilserina (permeabilización de membrana plasmática) y apoptosis, acompañada de condensación de cromatina y pérdida de ADN.

El equipo de Rezaakhsh (2017) investigó el efecto de la HCQ en angiogénesis y capacidad proliferativa de células tumorales. En su publicación demuestran *in vitro* disminución de la viabilidad de células endoteliales participantes en angiogénesis, asociándola con apoptosis por liberación de enzimas lisosomales por efecto de la HCQ y sensibilización de las células a agentes antineoplásicos por bloqueo de funciones autofagosómicas por parte de la HCQ. También señalan que la HCQ reprime la actividad metabólica y la proliferación de algunas células tumorales mediante la modulación de la fosforilación de cinasas extracelulares mediadas por señal 1 y 2, y que impide la migración celular en cáncer pancreático, mediante el bloqueo de la unión de la quimiocina CXCL12 con su receptor CXCR4. Wallace y sus colaboradores (2012) agregan que la HCQ reduce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en células epidérmicas. Por otro lado, HCQ también inhibe síntesis proteica y posee capacidad para prevenir mutaciones en células con altos índices mitóticos (Sardana et al., 2020).

La HCQ, según mencionan Sardana y sus colaboradores (2020), es capaz de desplazar la luz en las células epidérmicas debido al aumento de la concentración y acumulación de melanina en ellas, absorbiendo la luz UV, y generando así una filtración de la misma; presenta inhibición de reacciones inflamatorias inducidas por los rayos UV; se intercala entre pares de bases nitrogenadas, estabilizando el ADN y regulando la transcripción del ARN; reduce la expresión de citocinas proinflamatorias en la piel.

Toxicología.

Existen efectos adversos asociados al uso de hidroxicloroquina, principalmente alteraciones gastrointestinales y del sistema nervioso central, así como efectos dermatológicos, sin embargo, son de magnitud leve y suelen desaparecer al interrumpir el tratamiento; por otro lado, es capaz de causar retinotoxicidad, ototoxicidad y neuromiototoxicidad irreversibles en porcentajes de incidencia mucho más bajos (Restrepo, 2006; Ben-Zvi et al., 2012). Estos efectos y otros reportados en la literatura son dependientes de la dosis y se presentan con mayor frecuencia si el fármaco se utiliza por

tiempo prolongado (aumento de las probabilidades de toxicidad 5 veces a partir de los 7 años de tratamiento, resultando una exposición total a más de 1,000 g del fármaco), en parte debido al acumulamiento de proteínas ubiquitinadas en los lisosomas expuestos al fármaco (Wolfe y Marmor, 2010; Browning, 2014; Stokkermans et al., 2023).

La retinotoxicidad de este fármaco es el efecto adverso de mayor relevancia clínica, por ende, sus manifestaciones son las más estudiadas y las más vigiladas durante tratamientos que se extienden por años. La CQ y la HCQ se unen a la melanina del epitelio pigmentario de la retina, con la posibilidad de causar pérdida irreversible de fotorreceptores y atrofia del propio epitelio pigmentario, ya que impiden la acción de sus lisosomas de degradar los segmentos envejecidos de los fotorreceptores causando su acumulamiento, lo que promueve la migración de estas células a las capas externas de la retina (Stokkermans et al., 2023).

Toler (2004) expone que la CQ posee retinotoxicidad originada por la lipoperoxidación desencadenada por el estrés oxidativo generado por esta molécula; el fármaco inhibiría a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que disminuiría las concentraciones de NADPH reducido en la retina, provocando una baja en la concentración de glutatión reducido en la retina; una cantidad insuficiente de glutatión reducido no permitiría la neutralización de los oxidantes formados por acción de la mieloperoxidasa en el epitelio pigmentario durante la degradación de los segmentos envejecidos de los fotorreceptores, permitiendo la lipoperoxidación y la oxidación de residuos de cisteína en diversas proteínas de los fotorreceptores. El hecho de que la retinotoxicidad de CQ y la de HCQ posean características similares, aunado al parecido entre las estructuras químicas de ambas, indica que los mecanismos por los que se desarrollan estas condiciones pudieran ser semejantes (Yam y Kwok, 2006).

Hidroxicloroquina y estrés oxidativo.

Existe evidencia en la literatura de la capacidad de algunos antimaláricos de la familia de las 4-aminoquinolinas para generar desbalances entre moléculas prooxidantes y antioxidantes en organismos vivos, tanto en favor del daño oxidativo, como en favor de

la defensa antioxidante. Al ser moléculas estructuralmente similares a la HCQ, se propone que ésta pudiera compartir dicha capacidad en cierta medida.

En un estudio conducido por Farombi (2000), el tratamiento con amodiaquina resultó en aumento en la actividad de las enzimas SOD y GPx, y en los niveles de MDA, y a su vez, mostró disminución en la actividad de la catalasa y en los niveles de vitamina A y C y β -caroteno en hígados de ratas. Magwere y sus colaboradores (1997) denotaron propiedades similares para CQ en un estudio en el que un tratamiento crónico generó aumento en la actividad de SOD y disminución en las actividades de GPx-selenio, catalasa y NADPH-quinona reductasa en hígados de ratas.

La CQ generó un aumento en TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y en carbonilos de proteínas en riñones y cerebros de ratas en un estudio de Giovanella y su equipo (2015).

Toler (2004) explica que la CQ puede inhibir la vía de las pentosas fosfato en las especies de *Plasmodium*, lo que resulta en disminución de las concentraciones de glutatión reducido, disminuyendo así la capacidad del parásito para metabolizar a la ferriprotoporfirina IX, la cual participa en la formación de ERO dentro del parásito, causando lipoperoxidación de su membrana y su muerte.

Esta capacidad de la CQ de disminuir la concentración de glutatión reducido y de algunas enzimas antioxidantes se ha observado igualmente en células de mamíferos con alta actividad metabólica, lo que implica que el fármaco pueda potenciar el estrés oxidativo existente dentro de ellas, permitiendo la propagación de ERO previamente generadas en su interior por diversos mecanismos; situación actualmente estudiada con el fin de evaluar la actividad tumoricida de fármacos con mecanismos de acción similares, que pudieran impulsar la propagación de ERO generadas por radioterapia o quimioterapia en diversos tipos de células cancerosas (Toler et al., 2006).

Uzar y sus colaboradores (2012) llevaron a cabo un estudio en el que se observaron niveles de MDA y NO aumentados significativamente en nervio ciático y tejido muscular

de rata, al igual que aumentos en las actividades de SOD y GPx, luego de un tratamiento con HCQ por vía oral. A pesar de haberse utilizado dosis 25 veces mayores a la terapéutica en su tratamiento (160 mg/kg/día), este estudio demuestra el potencial que tiene la HCQ para generar estrés y daño oxidativo en tejidos periféricos, hacia los que tiende a difundir y almacenarse debido a sus propiedades fisicoquímicas.

Por otra parte, se ha generado evidencia de que los antimaláricos pudieran tener un efecto antioxidante en algunos tipos de células. Miyachi y sus colaboradores (1986) observaron que la CQ y la quinacrina, en concentraciones terapéuticas, son capaces de disminuir la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ y $\bullet\text{OH}$ en leucocitos polimorfonucleares debido a la afección de sus funciones lisosomales. La HCQ demostró disminuir de manera significativa la concentración de óxido nítrico y MDA, así como los niveles de ERO intracelulares totales (análisis por citometría de flujo) en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (Rezabakhsh et al., 2017).

HCQ ha probado efectividad para mejorar la función endotelial en modelos murinos de lupus eritematoso sistémico, principalmente por reducción de la actividad de NADPH oxidasa y de la expresión génica que las subunidades NOX-1 y p47^{phox} (Gómez-Guzmán et al., 2014; Rahman et al., 2016; Floris et al., 2018).

3.8. Medición de Indicadores de estrés oxidativo.

Al igual que el envejecimiento, un sinnúmero de enfermedades se encuentran estrechamente ligadas al daño oxidativo a biomoléculas, por lo que en recientes décadas se ha erigido una creciente tendencia a estudiar los mecanismos por los que las ERO generan este daño, así como a buscar formas y desarrollar métodos para realizar mediciones efectivas y representativas del estado oxidativo y niveles de estrés oxidativo presentes en el organismo. Lo anterior con el fin de establecer una correlación entre estos datos y el surgimiento o progresión de las diversas patologías que se encuentran asociadas a estrés oxidativo a la fecha, y sentar las bases para la búsqueda de estrategias de prevención y auxilio en su tratamiento, basadas en la regulación del estado oxidativo del organismo.

Debido a que las ERO son moléculas altamente reactivas, y por ende inestables, poseen semividas del orden de los milisegundos en el caso de las no radicáticas, y de los órdenes de micro y nanosegundos aquellas de carácter radicático, lo cual vuelve poco factible realizar mediciones de la concentración de estas especies en fluidos corporales o sobrenadantes de cultivos almacenados (Egea et al., 2017; Pérez-Gastell y Pérez-de-Alejo, 2000). Sin embargo, esta misma propiedad favorece a que las ERO interactúen con las macromoléculas en el organismo, oxidando éstas últimas a productos más estables, cuya medición es más viable y puede realizarse mediante diversos tipos de técnicas analíticas.

En décadas recientes la tendencia en evaluación del estado oxidativo del organismo ha sido utilizar los productos de la oxidación de biomoléculas por ERO como biomarcadores de daño por estrés oxidativo (Tabla 4). De igual manera, se han utilizado como biomarcadores de estrés oxidativo, aquellas enzimas que son fuente de producción de ERO; nitratos y nitritos para evaluar generación de óxido nítrico; así como diversas moléculas antioxidantes (Tabla 5) (Egea et al., 2017; Pérez-Gastell y Pérez-de-Alejo, 2000; Elejalde-Guerra, 2001; Constanza-Corrales y Muñoz-Ariza, 2012). El principal reto para el gremio investigador existe en la estandarización, tanto de los métodos (técnicas, equipos, condiciones de procesamiento), como del diseño experimental, pues en cada estudio deben considerarse los factores de variación en la medición, como el ritmo circadiano, la fase postprandial, condiciones hormonales, y el hecho de que los resultados de estas mediciones pueden variar entre un tejido y otro (Elejalde-Guerra, 2001).

Tabla 4. Principales biomarcadores de estrés oxidativo y daño biomolecular.

Biomolécula	Método/Biomarcador
Lípidos	Quimioluminiscencia TBARS. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Aldehídos: 4-hidroxiálquenos, Malondialdehído (MDA). Dienos conjugados. Peróxidos. Hidrocarburos volátiles en aire espirado: Etano, pentano.
Proteínas	Grupos carbonilo. Grupos sulfhidrilos. Fragmentación de proteínas. Actividad de enzimas. Grupos amino libres.
ADN	Bases modificadas: 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), 8-oxo-7,8-dihidroguanosina (8-oxoGuo), Glicol de timidina (TG).
Flavonoides, licopenos	Neutralizan oxígeno singulete. Quelantes de metales.
Otros	Productos finales de glicación de proteínas, lípidos y ADN. Compuestos fluorescentes: Lipofuscina. Isoprostanos e isolevuglandinas (oxidación de ácido araquidónico). Sintasa endotelial del óxido nítrico. Capacidad oxidante total; método del naranja de xilenol.

Modificada de: Mayor-Oxilia, R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Apoyo en Pérez-Gastell PL, Pérez-de-Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo.

Tabla 5. Principales moléculas antioxidantes utilizadas como biomarcadores en estrés oxidativo.

Tipo de molécula	Método/Biomarcador
Enzimáticas	Catalasa. CuZnSOD, MnSOD. Glutación peroxidasa (GPx). Glutación S-reductasa. Tiorredoxina. Ferreodoxina. Transferrina.
No enzimáticas	Ácido cítrico. Tocoferoles. Betacarotenos. Ubiquinona. Flavonoides. Ácido úrico. Ceruloplasmina. Melatonina. Glutación.
Capacidad antioxidante total	Reducción del catión radical de ABTS ^{•+} .

4. Justificación

Debido al daño que ocasiona sobre lípidos de membrana, proteínas y ADN, el estrés oxidativo ha sido vinculado tanto a procesos del envejecimiento, como a diversos tipos de patologías, tales como asma, cáncer, aterosclerosis, SIDA, enfermedades neurodegenerativas, y padecimientos inflamatorios; de manera que una medición precisa del estrés oxidativo, por métodos estandarizados, podría utilizarse en clínica como factor de riesgo de numerosas patologías.

Existe evidencia para denotar al estrés oxidativo inducido por diversos fármacos de uso común como mecanismo de toxicidad en numerosos tejidos como hígado, riñón, sistemas nervioso y cardiovascular.

Por sus propiedades antiinflamatorias e inmunorreguladoras, la HCQ usualmente forma parte de tratamientos prolongados de administraciones diarias. De esta forma, aumenta la incidencia y magnitud de los efectos adversos generados por el fármaco, así como las probabilidades de que genere un desequilibrio entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes.

Es de interés evaluar el efecto de la HCQ sobre biomarcadores de daño molecular por estrés oxidativo y su posible relación con la aparición de efectos adversos.

El objetivo del presente estudio aleatorizado es evaluar este efecto en ratas aplicando dosis diarias de 6.5 y 35 mg/kg/d de HCQ (6.5 mg/kg corresponde a la dosis habitual utilizada en el manejo de la artritis reumatoide), administrada por vía oral durante 3 meses.

Al demostrar un aumento en los indicadores de daño por estrés oxidativo, existirá evidencia para llevar a cabo estudios en humanos tratados a largo plazo con este fármaco y, posteriormente, explorar el empleo de tratamientos antioxidantes complementarios al uso de HCQ, de manera que sirva de antecedente para diseñar e implementar tratamientos con menos efectos adversos, siendo evidente el impacto que tendría sobre el manejo de esos padecimientos.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de las dosis de 6.5 y 35 mg/kg/día de HCQ administrada vía oral durante tres meses a ratas Wistar adultas sanas sobre los niveles sanguíneos de NO, MDA, PAOP, capacidad oxidante total y capacidad antioxidante total.

Objetivos específicos

- Estandarizar las metodologías de laboratorio para la cuantificación de los marcadores de daño por estrés oxidativo a estudiar (NO, MDA, PAOP, capacidad oxidante total, capacidad antioxidante total).
- Conformar 3 grupos de 6 sujetos y permitir que se aclimaten al ambiente por dos semanas bajo las condiciones establecidas en la sección de Metodología.
- Obtener muestra sanguínea de todos los sujetos por corte de vena caudal previo al inicio del tratamiento.
- Iniciar el tratamiento. Grupo control: administración diaria de vehículo. Grupo experimental A: administración diaria de 6.5 mg/kg de HCQ. Grupo experimental B: administración diaria de 35 mg/kg de HCQ
- Determinación cuantitativa de los niveles de NO, MDA, PAOP, capacidad oxidante total, capacidad antioxidante total en condiciones basales.
- Obtener muestra sanguínea de todos los sujetos por corte de vena caudal una vez terminado el tratamiento (3 meses).
- Determinación cuantitativa de los niveles de NO, MDA, PAOP, capacidad oxidante total, capacidad antioxidante total en condiciones finales.
- Evaluar estadísticamente el efecto de la HCQ sobre los marcadores de daño oxidativo y capacidades oxidante y antioxidante.

6. Hipótesis

Hipótesis de Investigación.

Los marcadores de daño por estrés oxidativo estudiados (NO, MDA, PAOP) o el índice de estrés oxidativo presentarán un aumento en sus niveles séricos después de tres meses de administración vía oral de una dosis de 6.5 mg/kg/día de hidroxiclороquina a ratas Wistar albino adultas sanas.

Hipótesis Nula.

Los marcadores de daño por estrés oxidativo estudiados (NO, MDA, PAOP) y el índice de estrés oxidativo no presentarán un aumento en sus niveles séricos después de tres meses de administración vía oral de una dosis de 6.5 mg/kg/día de hidroxiclороquina a ratas Wistar albino adultas sanas.

7. Metodología

7.1. Tipo de estudio.

Estudio correlacional, prospectivo, longitudinal, aleatorizado, con intervención farmacológica.

7.2. Tamaño de muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula descrita por Cook y Rosner (1997) para comparación de medias entre dos muestras de distribución normal y mismo tamaño, usando una prueba de dos colas con un nivel de significancia ' α ' y poder ' $1 - \beta$ ', obteniendo así un resultado de $n=6$ para el presente estudio. Este tamaño de muestra es comparable con el de otros estudios de diseño experimental similar (Uzar et al., 2012) en los que se reporta el uso de muestras dentro del mismo rango.

$$n = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2}{\Delta^2} \quad \text{Ec. 4}$$

En la ecuación 4 se muestra la fórmula para obtener el tamaño de muestra para cada grupo de este diseño experimental, donde:

' Δ ' representa la diferencia entre las medias de ambos grupos;

' δ^2 ' es la varianza de cada grupo, identificada con el número del grupo correspondiente con un subíndice en el término.

7.3. Modelo animal y tratamiento

Se utilizaron 18 ratas de raza Wistar albino, hembras, adultas, de peso entre 200 y 250 g. Fueron colocadas en un cuarto a temperatura de 20-25 °C, manteniendo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Fueron provistas con agua y una dieta estándar *ad libitum*, como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se permitió un período de 2 semanas para aclimatación de los sujetos al ambiente de confinamiento, antes de iniciar la intervención.

Para este estudio se utilizó una mezcla racémica de sulfato de hidroxiclороquina de ACROS Organics™. Se formaron los grupos experimentales y cada sujeto fue pesado para el cálculo de la cantidad de fármaco a ser administrada en función de la dosis que le correspondía según su grupo de pertenencia. Se utilizó agua destilada como disolvente del fármaco, y se prepararon soluciones stock nuevas cada día en dos concentraciones (8 y 30 mg/mL). Se calculó el volumen de solución a administrar para cada uno de los sujetos en cada grupo y se procedió a aplicar la preparación por vía orogástrica, utilizando para ello sondas con grosor de 5 Fr y 38.5 cm de largo.

Los sujetos fueron divididos en tres grupos de 6 sujetos cada uno, de la siguiente manera:

- Grupo control: Les fue administrado sólo vehículo (1 mL de agua destilada) con sonda por vía oral, diariamente por tres meses.
- Grupo experimental A (dosis terapéutica): Les fue administrada una dosis de 6.5 mg de HCQ por kg de peso del sujeto, diariamente por tres meses con una sonda vía oral.
- Grupo experimental B (dosis aumentada): Les fue administrada una dosis de 35 mg de HCQ por kg de peso del sujeto, diariamente por tres meses con una sonda vía oral.

Los sujetos fueron pesados cada 15 días para realizar ajuste de la cantidad de fármaco a administrar en función al aumento gradual de peso y de acuerdo con el tratamiento correspondiente a cada uno.

7.4. Muestreo y determinaciones.

Se tomaron dos muestras sanguíneas mediante corte de la vena caudal en el extremo distal a cada sujeto de estudio: una antes de iniciar el tratamiento para definir las condiciones basales; y una al finalizar los tres meses de tratamiento para valorar la existencia de efecto sobre los marcadores de daño por estrés oxidativo.

Las muestras fueron centrifugadas 10 minutos a 3,500 rpm para obtener el suero y almacenadas a -20°C hasta el momento de ser procesadas siguiendo los protocolos definidos para cada marcador.

Se realizaron determinaciones de marcadores séricos de oxidación a biomoléculas, así como capacidades oxidante y antioxidante del organismo.

- Óxido nítrico: Las concentraciones de nitratos y nitritos, como una medida de la generación de óxido nítrico, pueden ser cuantificadas por el método de Griess. En un primer paso se convierten los nitratos a nitritos químicamente con el empleo de hojuelas de cadmio. A continuación, se hace reaccionar con el reactivo de Griess (sulfanilamida al 2% en medio ácido en conjunto con N-naftil-etilendiamina al 0.1%) para formar un compuesto 'azo' estable de color púrpura. La absorbancia de este producto a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de nitrito en la muestra. Se utiliza NaNO_2 como patrón (Sun et al., 2003).
- Malondialdehído: Ensayo basado en la reacción entre el N-metil-2-fenil-indol con el MDA. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de N-metil-2-fenil-indol, rindiendo un cromóforo estable que absorbe a 586 nm. El empleo de esta longitud de onda y la temperatura de incubación (45 °C) minimizan las interferencias presentes en otros métodos para determinar este aldehído, producto final del proceso de peroxidación lipídica. Se utiliza 1,1,3,3 tetrametoxipropano como patrón (Esterbauer, 1990).
- Productos avanzados de la oxidación de proteínas: Se determina siguiendo la transformación de los iones yodo a yodo diatómico que provocan los PAOP siguiendo el cambio de D.O. a 340 nm. Se utiliza como patrón cloramina T y los resultados se expresan como $\mu\text{mol/L}$ equivalentes a cloramina T (Witko-Sarsat et al., 1998).
- Capacidad oxidante total: El ensayo se basa en la conversión de los iones Fe^{2+} en Fe^{3+} por parte de varias especies oxidantes contenidas en la muestra en medio ácido. El Fe^{3+} forma un complejo coloreado con el xilenol naranja que es detectable por medición espectrofotométrica a 560 nm. Se utiliza peróxido de Hidrógeno como patrón y los resultados se expresan como $\mu\text{mol/L}$ equivalentes a H_2O_2 (Erel O, 2005).
- Capacidad antioxidante total: Se emplea una solución rica en catión radical de ABTS^{•+}, la cual es decolorada por los antioxidantes presentes en la muestra según sus concentraciones y capacidades antioxidantes. Este cambio de color es medido por el cambio en la absorbancia a 660 nm. Se utiliza trolox como patrón y los resultados se expresan como $\mu\text{mol/L}$ equivalentes a trolox (Erel, 2004).
- Índice de estrés oxidativo: Es un indicador de oxidación resultante de calcular la razón de la capacidad oxidante total entre la capacidad antioxidante total (Isik et al., 2007).

7.5. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos mediante los procedimientos anteriormente descritos fueron sometidos a un análisis de homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene.

En la búsqueda de diferencias entre grupos, se compararon las medias de las concentraciones de cada marcador sérico a través de ANOVA de una vía y, posteriormente, se llevaron a cabo pruebas de Tukey (para varianzas estadísticamente similares) y de Games-Howell (para varianzas estadísticamente distintas) para comparaciones por parejas de grupos.

A su vez, la búsqueda de diferencias entre los datos antes y después de la intervención farmacológica se realizará a través de la comparación de medias con la prueba 't' de Student para muestras independientes. Se estableció un nivel de significancia estadística con valor de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 24.

7.6. Aspectos Éticos.

El presente estudio se desarrolló en completo apego a la legislación aplicable en materia de protección al ambiente, tal es la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo; así como la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8. Resultados.

8.1. Fase experimental: estandarización de metodologías y medición de marcadores.

Durante la fase preparativa o pre-experimental del estudio se llevaron a cabo corridas de prueba o piloto con el fin de validar los protocolos experimentales obtenidos de la literatura, para lo cual se evaluó y ajustó el funcionamiento de los equipos automatizados requeridos para el desarrollo de estos procedimientos, se adquirió el material consumible y no consumible necesario, fueron optimizadas las variables o condiciones experimentales especificadas en cada protocolo. De esta forma fueron estandarizadas las metodologías de cuidado y manejo de los sujetos de prueba, de obtención de la muestra, de administración del tratamiento, y aquéllas para la medición de los indicadores séricos seleccionados para el estudio.

Para la medición de los indicadores séricos de daño oxidativo y actividades oxidante y antioxidante en los sujetos de prueba, se llevaron a cabo las técnicas de colorimetría descritas en la sección de 'metodología', previa optimización de las condiciones de operación en ajuste a las instalaciones y material disponible.

Posterior a la conclusión del proceso de estandarización se realizó una toma de muestra y se ejecutaron las mediciones de marcadores, definidas como "condiciones basales" o "inicio". Posteriormente se condujo la intervención farmacológica durante 80 días. Al final del tratamiento se realizó una nueva toma de muestra con sus mediciones correspondientes, definidas como "condiciones finales" o "final". En las siguientes tablas (Tabla 6, 7 y 8) se condensan los valores de concentración medidos para cada indicador por sujeto, en sus respectivos grupos.

Tabla 6. Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo control al inicio y final del tratamiento.

# muestra	COT		CAT		PAOP		MDA		NO		IEO	
	$\mu\text{M-H}_2\text{O}_2$		mM-Trolox		$\mu\text{M-Cloramina T}$		μM		μM			
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
2	14.09	27.55	2.14	0.73	41.56	33.94	5.38	3.94	48.38	57.38	6.59	37.64
5	17.51	14.66	1.86	1.01	18.83	17.53	2.66	3.12	69.15	47.10	9.41	14.45
6	26.25	26.20	2.01	1.15	44.77	69.17	5.61	3.12	79.15	53.54	13.08	22.87
7	12.74	15.47	2.00	1.26	32.27	20.74	4.76	2.85	96.08	26.62	6.36	12.29
11	9.05	21.48	1.81	0.78	36.33	33.55	2.90	4.77	76.08	32.78	5.00	27.54
VI	8.61	12.28	1.06	0.95	19.77	18.56	3.01	2.03	22.81	36.47	8.12	12.93

Tabla 7. Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo experimental de 6.5 mg/kg al inicio y final del tratamiento.

# muestra	COT		CAT		PAOP		MDA		NO		IEO	
	$\mu\text{M-H}_2\text{O}_2$		mM-Trolox		$\mu\text{M-Cloramina T}$		μM		μM			
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
1	8.50	25.99	2.01	0.81	29.26	35.37	3.75	4.03	106.85	58.15	4.22	32.20
12	9.23	15.65	2.18	0.74	17.44	23.92	3.44	4.01	63.77	52.39	4.23	21.10
3	11.66	19.95	1.97	1.22	38.07	35.49	4.22	3.75	43.00	14.31	5.91	16.34
4	15.35	23.18	1.92	0.65	32.10	35.31	5.85	4.12	93.00	53.54	8.00	35.59
I	5.57	14.30	1.11	1.17	26.28	34.92	2.78	2.74	29.48	59.22	5.02	12.24
II	5.86	10.07	1.19	1.10	35.54	31.76	2.93	1.74	53.19	34.90	4.92	9.16

Tabla 8. Valores de concentración de los indicadores de estrés oxidativo en el grupo experimental de 35 mg/kg al inicio y final del tratamiento.

# muestra	COT		CAT		PAOP		MDA		NO		IEO	
	$\mu\text{M-H}_2\text{O}_2$		mM-Trolox		$\mu\text{M-Cloramina T}$		μM		μM			
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
10	6.88	11.54	1.83	1.35	10.81	11.26	3.05	2.42	87.62	62.72	3.76	8.53
9	6.25	16.93	2.30	1.20	13.16	24.80	2.97	3.03	80.69	18.92	2.71	14.11
15	18.70	10.81	1.35	1.18	31.11	10.30	4.18	2.42	55.31	68.00	13.81	9.17
13	11.12	14.53	2.11	1.22	36.62	19.50	4.60	2.58	73.00	66.62	5.26	11.90
IV	10.93	8.05	1.06	1.13	25.74	14.23	3.71	1.67	22.07	25.49	10.31	7.13
V	20.64	9.68	1.07	1.16	33.32	36.11	4.49	1.67	30.96	74.12	19.25	8.32

8.2. Procesamiento estadístico de datos.

Una vez terminadas las mediciones y la recolección de datos se realizó el procesamiento estadístico de éstos para evaluación del efecto de los distintos esquemas de tratamiento, mediante el análisis de las posibles diferencias entre las medias de los tres grupos experimentales a ambos momentos del muestreo, así como las diferencias que pudieran existir entre las mediciones previas y posteriores al tratamiento dentro de cada uno de los grupos. Para este efecto, fijamos el valor de significancia en $p < 0.05$ para las distintas pruebas estadísticas realizadas.

8.2.1. Análisis de homogeneidad de varianzas.

La primera fase del análisis consistió en la obtención de las medias estadísticas y desviaciones estándar de las variables dependientes (marcadores de daño oxidativo) y, posteriormente, la ejecución de pruebas de homogeneidad de varianza en los dos momentos del muestreo por separado, utilizando el estadístico de Levene (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de media de concentración y desviación estándar para marcadores séricos de daño por estrés oxidativo y actividad pro y antioxidante.

Marcadores de daño	Grupo control		Dosis 6.5 mg/kg		Dosis 35 mg/kg	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
COT	14.71±6.55	18.02±5.69	9.36±3.70	18.19±5.94 *	12.42±5.99	11.92±3.26
CAT	1.81±0.39	1.03±0.18 *	1.73±0.46	0.95±0.24 *	1.62±0.54	1.21±0.08
PAOP	32.25±10.92	31.91±21.80	29.78±7.38	32.80±4.57	25.13±10.81	19.37±9.84
MDA	4.05±1.35	3.18±1.00	3.83±1.12	3.40±0.96	3.84±0.71	2.30±0.54 *
NO	65.28±25.93	39.30±10.90	64.88±29.74	45.42±17.58	58.28±27.00	52.69±23.97
IEO	8.09±2.88	18.00±7.11*	5.33±1.51	21.00±10.92*	9.17±6.37	9.83±2.64

Unidades de concentración: COT, MDA, NO en μM ; CAT en mM equivalente a Trolox; PAOP en μM equivalente a Cloramina T. * $p < 0.05$ para hipótesis de igualdad de medias al inicio y al final en este grupo.

Tabla 10. Prueba de homogeneidad de varianzas de las variables dependientes previo al inicio de la intervención farmacológica.

Variable	Estadístico de Levene	Valor de p
COT	.898	.428
CAT	1.452	.265
PAOP	.865	.441
MDA	2.594	.108
NO	.104	.902
IEO	6.557	.009

Tabla 11. Prueba de homogeneidad de varianzas de las variables dependientes terminada la intervención farmacológica.

Variable	Estadístico de Levene	Valor de p
COT	1.903	.186
CAT	7.496	.006
PAOP	3.316	.066
MDA	.790	.473
NO	2.944	.086
IEO	5.197	.021

En la Tabla 10 se puede apreciar que existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los grupos experimentales para la variable IEO ($p=0.009$) en las mediciones realizadas previo al inicio del tratamiento. Por otra parte, en las mediciones efectuadas una vez terminado el período de intervención se observan diferencias entre las varianzas de los grupos para el caso de CAT ($p=0.006$) e IEO ($p=0.021$) (Tabla 11).

8.2.2. Análisis de medias entre grupos experimentales previo a la intervención farmacológica.

En la Tabla 12 se observa que, en la aplicación de ANOVA de una vía, ninguna de las variables dependientes presentó una diferencia significativa entre los grupos experimentales antes de iniciar el período de tratamiento con hidroxycloroquina.

Tabla 12. ANOVA de una vía entre grupos, previo a intervención farmacológica.

Variable dependiente	Estadístico F	Valor de p
COT	1.400	.277
CAT	.255	.778
PAOP	.812	.462
MDA	.083	.920
NO	.122	.886
IEO	1.377	.282

En las Figura 10 y 11 se presentan los gráficos de caja para cada variable dependiente, en las que se pueden apreciar la distribución de las mediciones y el contraste de éstas entre los tres grupos experimentales. En estas gráficas se observa el valor p que define la significancia de la similitud entre las mediciones de cada grupo y los otros.

8.2.3. Análisis de medias entre grupos experimentales posterior a la intervención farmacológica.

El ANOVA realizado entre los grupos, terminada la fase experimental, no muestra diferencias significativas en ninguna de las variables dependientes, sin embargo, existen algunas tendencias a la significancia en los casos de COT, CAT, MDA e IEO. Lo anterior puede observarse en la Tabla 13, así como en los gráficos de caja presentados posteriormente para cada indicador de estrés oxidativo.

Tabla 13. ANOVA de una vía entre grupos, posterior a la intervención farmacológica.

Variable dependiente	Estadístico F	Valor de p
COT	2.898	.088
CAT	3.187	.072
PAOP	1.859	.192
MDA	2.804	.095
NO	.707	.510
IEO	3.342	.065

Concentraciones de biomarcadores previas al tratamiento

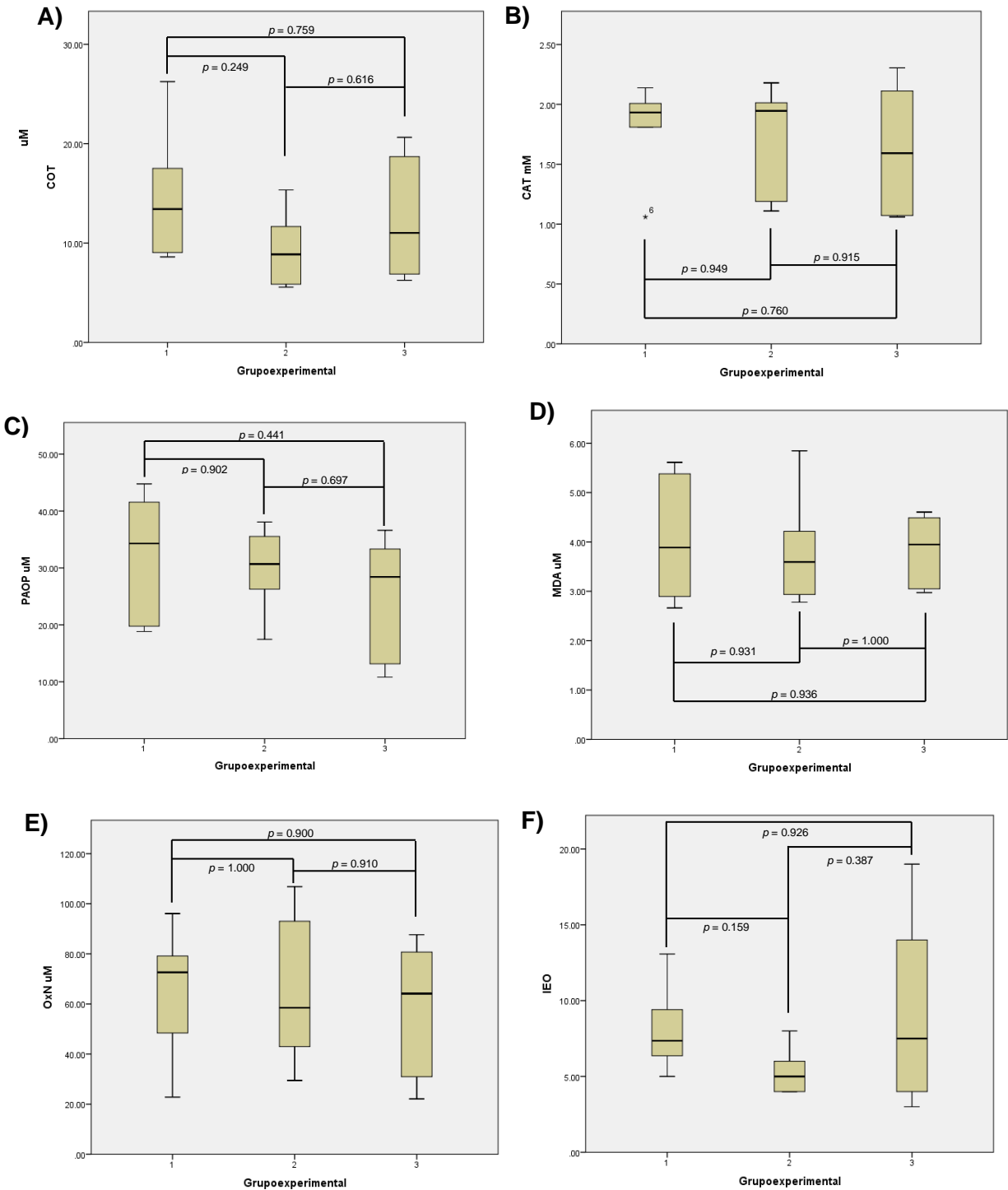


Figura 10. Gráficos de caja para las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo en cada grupo experimental previas al tratamiento, donde: 1 = Grupo control; 2 = Grupo A (6.5 mg/kg); 3 = Grupo B (35 mg/kg). A) COT. Valores de significancia p para equivalencia de medias por la prueba de Tukey. B) CAT. Prueba de Tukey. C) PAOP. Prueba de Tukey. D) MDA. Prueba de Tukey. E) NO (OxN). Prueba de Tukey. F) IEO. Prueba de Games-Howell.

Concentraciones de biomarcadores al terminar el tratamiento

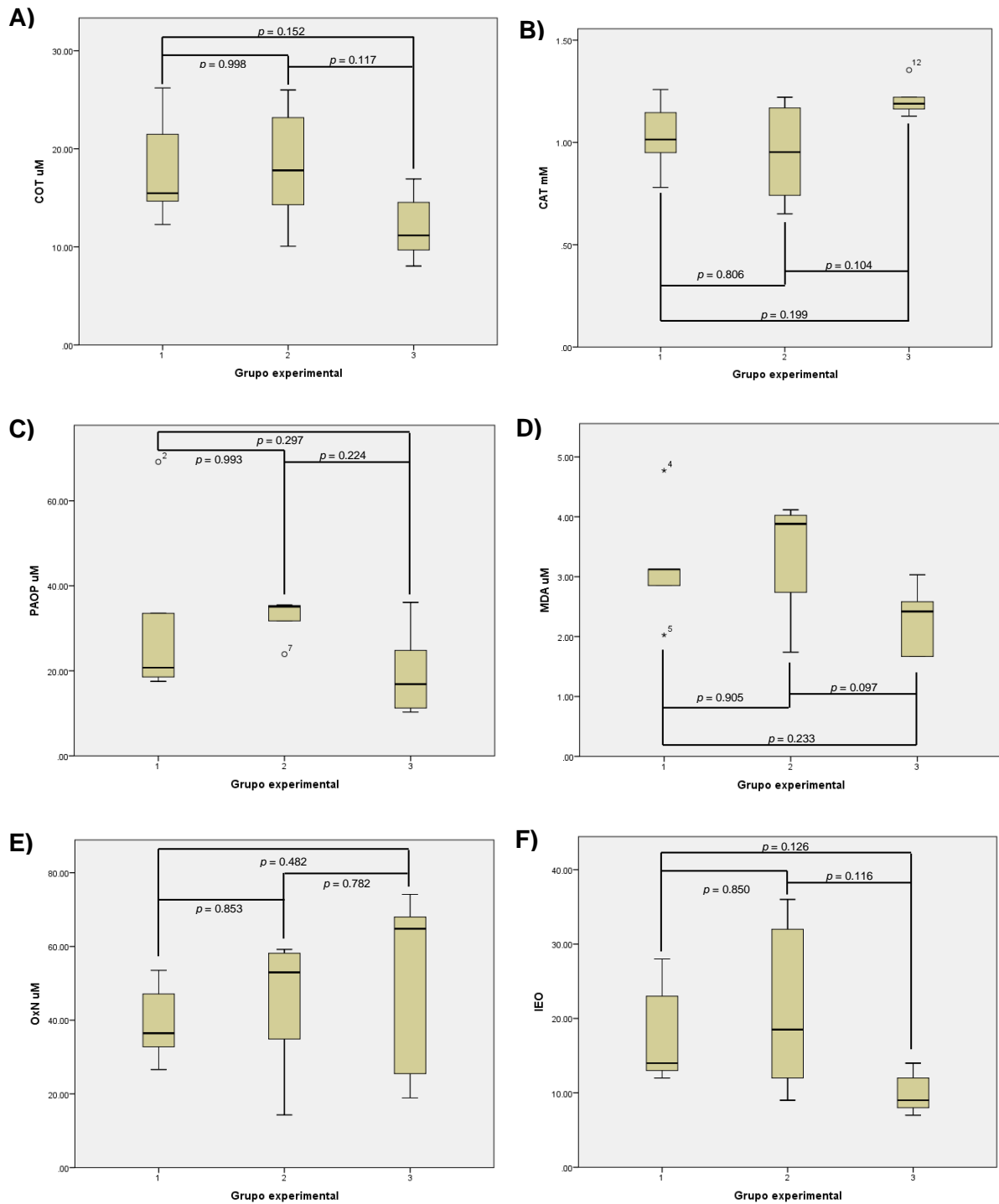


Figura 11. Gráficos de caja para las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo en cada grupo experimental una vez terminado el tratamiento, donde: 1 = Grupo control; 2 = Grupo A; 3 = Grupo B. **A)** COT. Valores de significancia p para equivalencia de medias por la prueba de Tukey. **B)** CAT. Prueba de Games-Howell. **C)** PAOP. Prueba de Tukey. **D)** MDA. Prueba de Tukey. **E)** NO (OxN). Prueba de Tukey. **F)** IEO. Prueba de Games-Howell.

8.2.4. Análisis de medias antes y después de la intervención farmacológica.

Se utilizó el estadístico 't' de Student para probar la hipótesis de igualdad de medias entre datos previos y posteriores al período de tratamiento dentro de cada grupo, obteniendo los resultados siguientes (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de significancia p para las pruebas 't' de Student entre medias antes-después de la intervención farmacológica.

Marcadores de daño	Grupo control	Dosis 6.5 mg/kg Valores de p	Dosis 35 mg/kg Valores de p
COT	0.220	0.011*	0.862
CAT	0.001*	0.007*	0.118
PAOP	1.000	0.415	0.357
MDA	0.290	0.491	0.002*
NO	0.078	0.198	0.713
IEO	0.025*	0.017*	0.820

* $p < 0.05$; diferencia significativa entre datos iniciales y finales.

La prueba 't' de Student nos da como resultado diferencias estadísticamente significativas entre los datos previos y posteriores al tratamiento para los indicadores CAT ($p=0.001$) e IEO ($p=0.025$) en el grupo control; para los indicadores COT ($p=0.011$), CAT ($p=0.007$) e IEO ($p=0.017$) en el grupo experimental A; y para el indicador MDA ($p=0.002$) en el grupo experimental B. Estas diferencias, así como el sentido del efecto (aumento o disminución en la concentración), se pueden entender mediante los siguientes gráficos de caja (Figuras 12, 13 y 14).

Concentraciones por biomarcador antes y después del tratamiento en grupo control

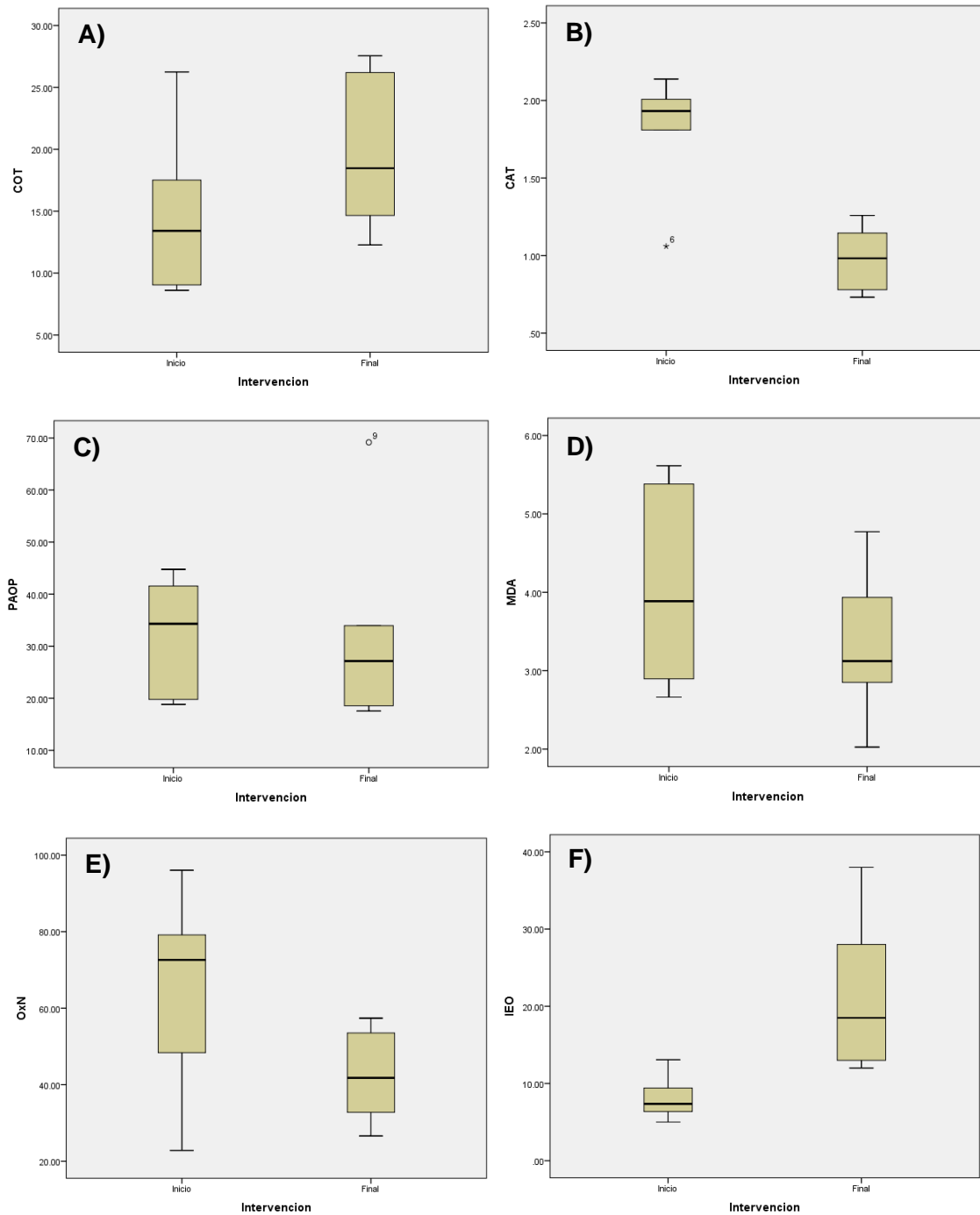


Figura 12. Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador de estrés oxidativo al inicio y al final del tratamiento para el grupo control. Valores p para los gráficos en la tabla 8.9. A) COT, μM ; B) CAT, mM equivalente a Trolox; C) PAOP, μM eq. a Cloramina T; D) MDA, μM ; E) NO (OxN), μM ; F) IEO.

Concentraciones por biomarcador antes y después del tratamiento en grupo experimental A

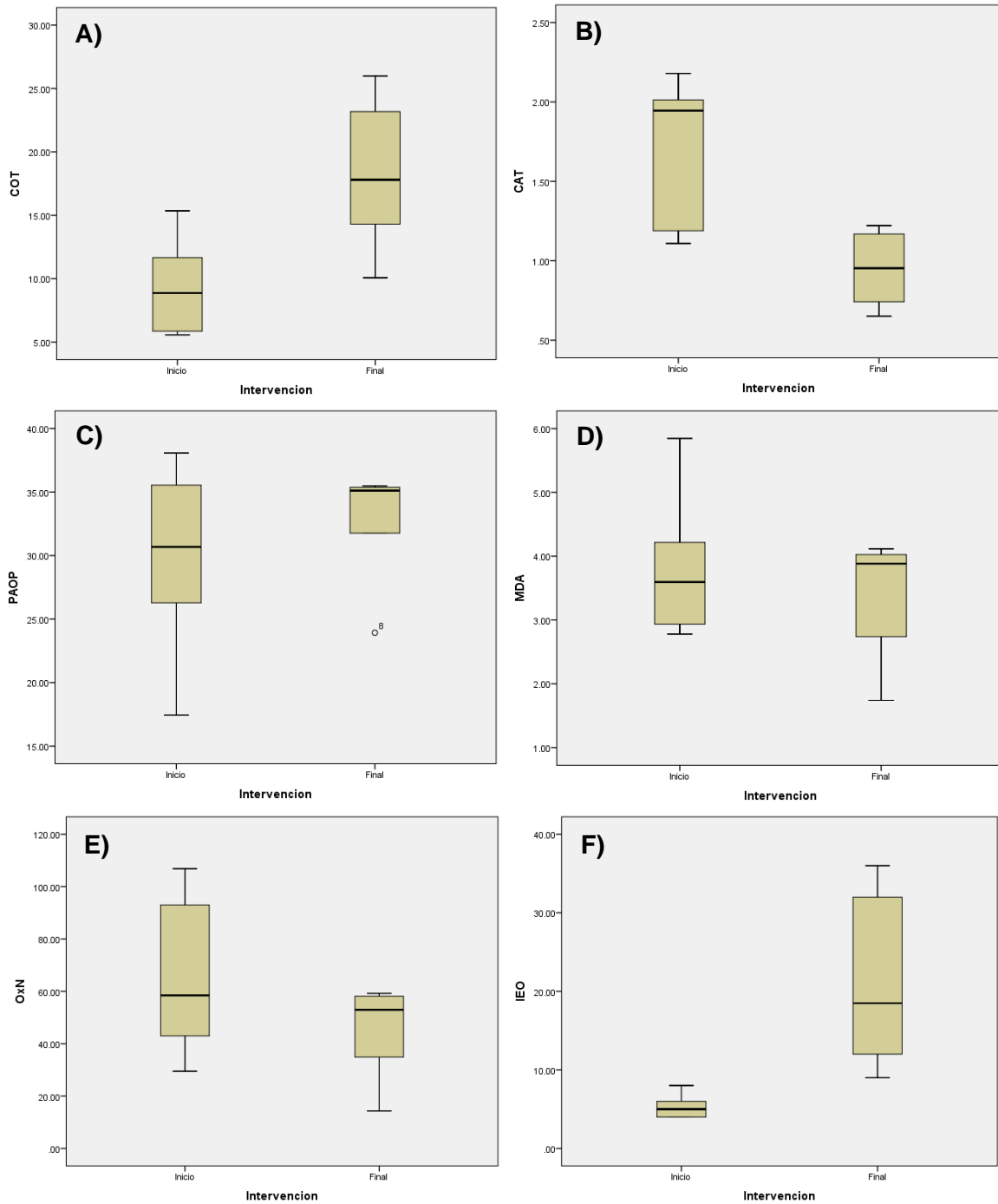


Figura 13. Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador al inicio y al final del tratamiento para el grupo experimental A (6.5 mg/kg). Valores *p* para los gráficos en la tabla 8.9. A) COT, µM; B) CAT, mM equivalente a Trolox; C) PAOP, µM eq. a Cloramina T; D) MDA, µM; E) NO (OxN), µM; F) IEO.

Concentraciones por biomarcador antes y después del tratamiento en grupo experimental B

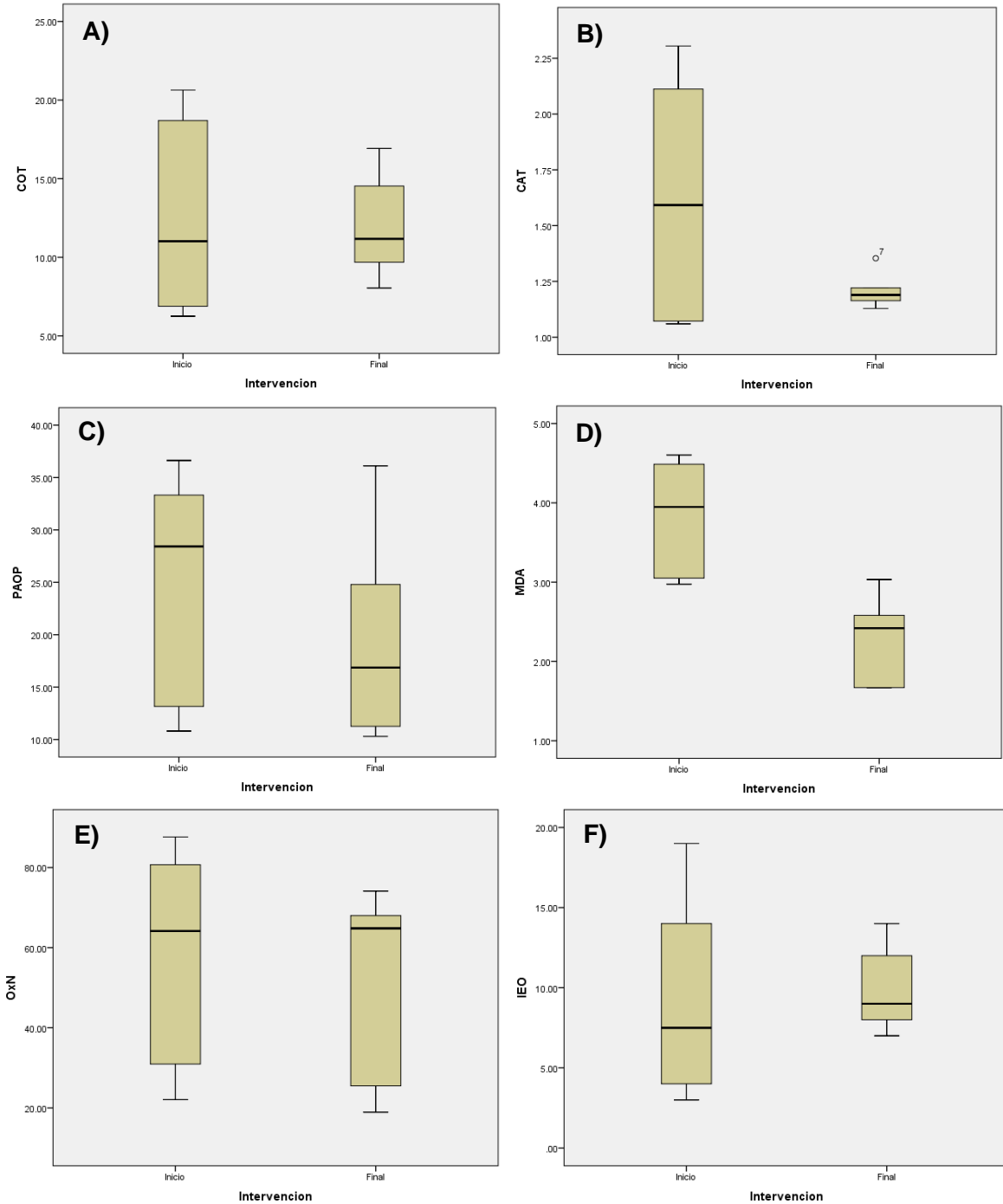


Figura 14. Gráficos de caja para las concentraciones de cada indicador al inicio y al final del tratamiento para el grupo experimental B (35 mg/kg). Valores p para los gráficos en la tabla 8.9. A) COT, μM ; B) CAT, mM equivalente a Trolox; C) PAOP, μM eq. a Cloramina T; D) MDA, μM ; E) NO (OxN), μM ; F) IEO.

9. Discusión.

Poca información existe en la que se establezca una correlación entre la administración de hidroxicloroquina y el surgimiento de variaciones en los niveles y actividad de biomoléculas u otros parámetros definidos para la valoración del estado oxidante y antioxidante en organismos vivos.

Uzar y sus colaboradores (2012) muestran evidencia de estrés oxidativo tras la administración de HCQ, señalando aumentos significativos en MDA y NO, productos finales de un desbalance entre especies prooxidantes y antioxidantes; aumentos en la actividad de SOD y catalasa, enzimas encargadas de degradar especies oxidantes; así como disminución en GPx y paraoxonasa-1, también enzimas antioxidantes.

Entre nuestros hallazgos podemos observar disminuciones en la capacidad antioxidante total una vez terminado el tratamiento para los grupos control y experimental bajo dosis terapéutica de HCQ (6.5 mg/kg/día), lo que indica posibles disminuciones en concentración o actividad de especies enzimáticas y no enzimáticas que forman parte del mecanismo de defensa antioxidante. Así mismo se aprecian consecuentes modificaciones en el índice de estrés oxidativo. Si bien, no determinamos qué moléculas son las que se encuentran disminuidas, este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos en ese estudio de Uzar et al. (2012), en donde también se observan disminuidas moléculas antioxidantes.

Por otra parte, nuestros resultados no muestran elevaciones significativas en los niveles de MDA, PAOP o NO, indicadores de daño a biomoléculas (a menudo atribuido a un importante estrés oxidativo, en magnitud o duración), en contraste con los datos expuestos por Uzar et al. (2012). Considerando que ambos estudios fueron realizados bajo un periodo de tiempo similar, esta diferencia se puede deber a dos factores, principalmente: la dosis del fármaco y el tipo de muestra estudiada.

Para su estudio, el equipo de Uzar utilizó una dosis de 160 mg/kg/día, que equivale a alrededor de 25 y 5 veces las dosis utilizadas en el presente estudio (6.5 y 35 mg/kg/día).

Melles y Marmor (2014) afirman que existe una correlación entre la dosis diaria de HCQ y el riesgo de toxicidad (la cual ha sido íntimamente ligada a estrés oxidativo en el uso de gran cantidad de fármacos), en parte debido a que la dosis es acumulativa en función de las propiedades farmacocinéticas de esta sustancia, como su alto volumen de distribución, extendido tiempo de permanencia en tejido, sus tasas de metabolismo y alta vida media de eliminación (Furst et al., 1999; Rainsford, 2015; Stokkermans y Trichonas, 2019).

A pesar de haber usado el mismo modelo animal, vía y forma de administración, las mediciones bioquímicas de los marcadores se realizaron en suero en el presente estudio, a la vez que, Uzar y sus colaboradores realizaron sus mediciones en tejido muscular y nervioso. Debido a sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, existe la tendencia del fármaco a difundir y acumularse en estos y otros tejidos profundos, encontrándose en cantidades mucho mayores en ellos que en suero o sangre total; esto, junto a las propiedades conformacionales y funcionales de dichos tejidos, pudiera explicar concentraciones más altas en periodos más cortos de tiempo dentro de estas estructuras, que permitirían mayor expresión de efectos tanto terapéuticos como adversos, inclusive, la posibilidad de que dichos efectos de la HCQ se den de manera particular en ciertos tejidos (Giovanella et al., 2015). Concordamos con autores quienes afirman que mediciones como las realizadas en el presente estudio pueden variar entre los distintos órganos en que se efectúen, en relación con esa afinidad para acumularse (Elejalde-Guerra, 2001; Rainsford et al., 2015); por ello, podrían esperarse niveles más altos de biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de tejido de los sitios de acumulación de HCQ.

Existen numerosos reportes que demuestran los efectos de otros antimaláricos, como la cloroquina, análogo estructural de HCQ, sobre el estado oxidativo de organismos vivos, en los que podemos observar disminuciones significativas en la actividad y concentración de diversas moléculas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, así como una producción acelerada y elevación en los niveles séricos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, al igual que aumentos en los niveles de biomoléculas con daño oxidativo, como son el MDA, los 4-hidroxi-alquenos, los carbonilos en proteínas y bases

nitrogenadas modificadas (Magwere, Naik y Hasler, 1997; Farombi, Adoro y Uhunmwangho, 2001; Farombi, Shyntum y Emerole, 2003; Toler, Noe y Sharma, 2006; Giovanella et al., 2015; Vessoni et al., 2016). En el presente estudio se encontró un aumento en la capacidad oxidante total en el suero de los sujetos tratados con dosis terapéutica de HCQ (6.5 mg/kg/día), lo que indica producción acelerada de ERON y elevación de sus niveles séricos, en similitud con su análogo CQ; no así en los marcadores de daño MDA, PAOP y NO, como se señala anteriormente. En el presente estudio no se encontró correlación entre la COT y estos marcadores de daño a biomoléculas, lo que pudiera sugerir que existe un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes, sin generar un daño oxidativo significativo aún.

Tras extensas revisiones sistemáticas de la literatura, de manera periódica, resalta que a la fecha no se ha documentado aumento significativo de las concentraciones de productos finales de oxidación de biomoléculas correlacionado con la administración de dosis terapéuticas de hidroxiclороquina. Lo anterior, en congruencia con las aseveraciones de numerosos autores de que HCQ posee una menor toxicidad que su análogo CQ, con frecuencia relacionada con el grupo hidroxilo presente en la cadena lateral de la HCQ (ausente en la CQ), con el volumen de distribución de CQ mayor al de HCQ, y con el hecho de que CQ presenta mayor disposición en diversos tejidos (Rainsford et al., 2015); esto no implica que la HCQ no comparta los efectos adversos de CQ, sino que esperamos los mismos efectos en menores magnitudes y a una razón de latencia mayor, lo que nos otorga margen para establecer terapias preventivas y correctivas (éstas últimas para aquellos efectos adversos reversibles).

Por otro lado, nuestro grupo experimental de dosis aumentada (35 mg/kg/día) presentó una disminución significativa de los niveles de MDA al cabo de 3 meses de tratamiento, lo que pudiera sugerir alguna forma de efecto protector contra ERON a dosis bajas de HCQ. Lo anterior en similitud con los resultados presentados por Gómez-Guzmán y sus colaboradores (2014), quienes observaron una disminución en MDA plasmático de ratas con lupus eritematoso sistémico tras haberlas tratado 5 semanas con 10mg/kg/día de HCQ vía sonda oral, posiblemente debido la disminución de la afección a diversos tejidos. De igual manera, Rezabakhsh y sus colaboradores (2017) notaron disminuciones

significativas en las concentraciones de NO y MDA posteriores al uso de HCQ, realizando exposiciones de cultivos celulares a altas concentraciones de glucosa para potenciar la producción de especies prooxidantes, con mediciones de los marcadores al cabo de uno, dos y tres días de incubación con el fármaco. En estos casos, HCQ pudiera cumplir una función protectora inhibiendo la formación de ERON, evitando así un daño extensivo a biomoléculas (Miyachi et al., 1986).

Algunos marcadores se comportaron como era esperado: para la dosis terapéutica ocurrió una disminución de CAT, así como aumentos en COT y en IEO; a su vez, si bien no significativas, el grupo experimental de dosis aumentada presenta diferencias similares: tendencias de disminución de CAT y ligero aumento del IEO. El hecho de que las tendencias presentadas en el grupo de dosis aumentada no alcancen significancia puede deberse a efectos adaptativos del organismo en que: algunas enzimas se vean sobreexpresadas en respuesta a la sobreproducción de ERON, lo que explicaría bajas en la formación de MDA, PAOP, NO y, consecuentemente, disminución en los niveles de COT al momento de la obtención de la muestra (Deavall et al., 2012; Uzar et al., 2012; Gómez-Oliván et al., 2014), al contrario de lo presentado por Uzar y sus colaboradores (2012), recalcando que la dosis utilizada por ellos es 5 veces mayor a los 35 mg/kg/día utilizados en el grupo de sujetos al que se hace referencia, lo que pudiera sobresaturar y rebasar a los mecanismos de adaptación, resultando en concentraciones elevadas de productos de oxidación; a la vez que otros compuestos enzimáticos y no enzimáticos pudieran encontrarse en su estado oxidado por haber interactuado con los prooxidantes, lo que estuviera generando aún una disminución en la CAT, pero en proporciones más pequeñas, ocurriendo lo mismo con el IEO.

Se observan otras relaciones en los resultados que no nos permiten correlacionar los cambios en los niveles de los biomarcadores con la administración de HCQ en los esquemas posológicos definidos en este estudio, principalmente, el hecho de que el grupo control presenta cambios muy similares a los del grupo experimental de dosis terapéutica: ambos grupos presentan elevaciones significativas en IEO; ambos presentan disminuciones significativas en CAT; en ambos hubo aumento en COT, sólo significativo para la dosis terapéutica; ambos grupos muestran disminuciones en concentración de

MDA y NO, las cuales fueron más leves en el caso del grupo con HCQ; el único comportamiento opuesto fue una disminución en las concentraciones de PAOP en el grupo control y un aumento en el caso del grupo con dosis terapéutica.

De igual forma, los análisis de varianzas que se llevaron a cabo en el presente estudio muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos de prueba para ningún biomarcador evaluado al término del tratamiento; sin embargo, se pueden apreciar tendencias a la significancia, mayormente en CAT y en IEO.

Un sinnúmero de autores señala que el estrés oxidativo está íntimamente involucrado en la toxicidad de los fármacos; de igual forma, Uzar y sus colaboradores (2012) proponen que el estrés oxidativo está implicado en la toxicidad de HCQ en algunos tejidos. Existen estudios que correlacionan la toxicidad de HCQ con la dosis diaria administrada y con la duración del tratamiento (Wolfe y Marmor, 2010; Melles y Marmor, 2014), factores que influyen directamente en la acumulación del fármaco.

Basándonos en lo anterior, y en relación con los resultados de Uzar y sus colaboradores (2012), donde correlacionan altas dosis de HCQ con daño oxidativo a biomoléculas y alteraciones en enzimas antioxidantes, sugerimos que la falta de correlación de dosis terapéuticas de HCQ con los biomarcadores evaluados en este estudio podría deberse principalmente a la corta duración del tratamiento. El tipo de muestra utilizada para las mediciones pudiera ser otro factor determinante en antimaláricos de amplio volumen de distribución y tendencias a acumulación.

Es necesaria más investigación para comprobar o descartar la existencia de una correlación entre la administración diaria vía oral de dosis terapéuticas de HCQ (6.5 mg/Kg/día) y biomarcadores de estrés oxidativo. Se sugieren diseños experimentales que incluyan periodos de tratamiento más extensos; se han observado aumentos en el riesgo e incidencia de efectos adversos de alta relevancia de HCQ, como la maculopatía, en rangos mayores a los 5 años de uso continuo. Para este efecto, es necesario cambiar el modelo animal, debido a la corta vida de los murinos.

Se propone efectuar las mediciones en muestras de diversos tejidos como homogenizados de hígado, riñón, o aquellos ricos en melanina como piel o retina; preferible basar esta elección en las regiones en que se presentan los efectos adversos de mayor interés de la HCQ.

Se alienta a ampliar la gama de biomarcadores, tanto de prooxidantes como de antioxidantes, sin embargo, se recomienda incluir productos finales de oxidación de lípidos y proteínas, así como capacidades oxidantes y antioxidantes totales. Algunas de estas otras moléculas pueden tener tiempos de vida muy cortos, verse más afectadas que otras por las condiciones del medio, otras (enzimas principalmente) poseen distintos mecanismos de regulación dependientes de señales específicas, y diversas características que pudieran dificultar su medición, al igual que su comparación con resultados de otros estudios (Magwere, Naik y Hasler, 1997; Isik et al., 2007; Noori, 2012).

10. Conclusiones.

El ANOVA realizado entre los tres grupos previo al inicio del tratamiento no mostró diferencias significativas en ninguna de las variables dependientes. El ANOVA realizado entre los tres grupos una vez terminada la fase experimental, no muestra diferencias significativas en ninguna de las variables dependientes, sin embargo, existen algunas tendencias a la significancia en los casos de COT, CAT, MDA e IEO, lo cual prueba que el fármaco tiene algún tipo de impacto (aumento o disminución) en el metabolismo y la regulación de las especies prooxidantes y antioxidantes del organismo vivo, y que el tipo y magnitud del impacto se ven influenciados por la dosis.

En la prueba 't' de Student, para probar la hipótesis de igualdad de medias entre el antes y el después en cada grupo, se observó una disminución significativa en los valores de CAT y un aumento significativo en los valores de IEO en el grupo experimental con dosis terapéutica, sin embargo, estas diferencias también fueron encontradas en el grupo control, por lo que se pueden atribuir al estrés propio del manejo físico del roedor o al curso natural de la vida del mismo, por lo que no se consideran para el ensayo de la hipótesis. Por otro lado, este mismo grupo mostró un aumento estadísticamente significativo en la COT, parámetro utilizado para el cálculo del IEO, por lo que podemos decir que se confirma la hipótesis de investigación, mas no debido a un aumento en los niveles de los marcadores de daño estudiados, sino a la elevación de otros marcadores de daño, o al aumento en la actividad de otras especies prooxidantes.

En esta misma prueba, el grupo experimental B (dosis aumentada) mostró una disminución significativa en la concentración de MDA. Esto representa un cambio en el sentido opuesto al planteado en la hipótesis de esta investigación, sin embargo, por tratarse de una dosis no contemplada dentro de ella, no podemos utilizar este hallazgo para confirmar ni rechazar dicha hipótesis; por otro lado, pudiera considerarse como base para posteriores estudios en los que intente correlacionarse la dosis con tipos y magnitudes del impacto de la HCQ sobre el daño oxidativo.

11. Referencias bibliográficas.

- Agarwal S, Sohal RS. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(25):12332-5.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:7915-22.
- Arzu S, Savas G, Mahmure A, Vedat H. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 2008; 41:538-43.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999; 93:1464–1476.
- Banerjee R. Redox biochemistry. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2008.
- Ben-Zvi I, Kivity S, Langevitz P, Shoenfeld Y. Hydroxychloroquine: From Malaria to Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 42:145-153.
- Berlett B, Stadtman R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15; 272(33):20313-6.
- Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 2014 Nov; 141(22):4206-18.
- Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ, Stöckl J. Generation and Biological Activities of Oxidized Phospholipids. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Apr 15; 12(8):1009–1059.
- Bose KS, Vyas P, Singh M. Plasma non-enzymatic antioxidants-vitamin C, E, beta-carotenes, reduced glutathione levels and total antioxidant activity in oral sub mucous fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Apr; 16(4):530-532.
- Boya P, Gonzalez-Polo R-A, Poncet D, Andreau K, Vieira HLA, Roumier T, Perfettini J-L, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*. 2003; 22(25):3927–3936.
- Browning DJ. Pharmacology of chloroquine and hydroxychloroquine. In: Browning DJ. *Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy*. Springer, New York, NY, 2014: 35-63.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2005; 131:1-87.

- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000; 87:840-844.
- Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol*. 2013; 1(1):353-8.
- Carvajal-Carvajal C. Productos finales de glicación (AGEs) y la nefropatía diabética. *Med Leg Costa Rica*. 2015; 32(1):1409-15.
- Higdon J. Selenio [Internet]. Centro de Información de Micronutrientes, Linus Pauling Institute de la Universidad Estatal de Oregon; 2001 [revisado en junio 2015 por Tsuji PA]. Minerales. Disponible en: <http://lpi.oregonstate.edu/es/mic/minerales/selenio>
- Chandran G, Sirajudeen KNS, Nik-Yusoff NS, Swamy M, Samarendra MS. Effect of the antihypertensive drug enalapril on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in kidney of spontaneously hypertensive rat. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 608512.
- Chat Ham WW. Traditional disease-modifying antirheumatic drugs: gold compounds, d-Penicillamine, sulfasalazine, and antimalarials. En: McCarty DJ, ed. *Arthritis and allied conditions*. Décimoprimera edición. Lea & Febiger, 1989: 930-4.
- Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, Rembold CM, Laher I. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 123(2):73-91.
- Choi DS, Blanco E, Kim Y-S, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH-M, Jin G, Chen C-L, Landis MD, Burey LA, Qian W, Granados SM, Dave B, Wong HH, Ferrari M, Wong STC, Chang Jc. Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells*. 2014 Sep; 32(9):2309–23.
- Collins KP, Jackson KM, Gustafson DL. Hydroxychloroquine: a physiologically-based pharmacokinetic model in the context of cancer-related autophagy modulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 Jun; 365(3):447–59.
- Constanza-Corrales L. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 2012; 10(18):213-25.
- Cook NR, Rosner BA. Sample size estimation for clinical trials with longitudinal measures: application to studies of blood pressure. *J Epidemiol Biostat*. 1997; 2:65–74.
- Danza A, Graña D, Goñi M, Vargas A, Ruiz-Irastorza G. Hidroxicloroquina en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas. *Rev Med Chile*. 2016; 144:232-40.
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *J Toxicol*. 2012; 2012:645460.

- Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34(5):960-4.
- Edwards MH, Pierangeli S, Liu X, Barker JH, Anderson G, Harris EN. Hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation.* 1997; 96(12):4380-4.
- Egea J et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* 2017; 13:94-162.
- Elejalde-Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna (Madrid).* 2001; 18(6):326-35.
- Emami J, Gerstein HC, Pasutto FM, Jamali F. Insulin-sparing effect of hydroxychloroquine in diabetic rats is concentration dependent. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1999; 77:118–23.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4):277-85.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38:1103-11.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186:407-21.
- Farombi EO. Influence of amodiaquine treatment on microsomal lipid peroxidation and antioxidant defense systems of rats. *Pharmacol Toxicol.* 2000 Dec; 87(6):249-54.
- Farombi EO, Adoro S, Uhunmwangho S. Antimalarial drugs exacerbate rat liver microsomal lipid peroxidation in the presence of oxidants. *Biosci Rep.* 2001; 21(3):353-9.
- Farombi EO, Olowu BI, Emerole GO. Effect of three structurally related antimalarial drugs on liver microsomal components and lipid peroxidation in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000; 126(3):217-24.
- Farombi EO, Shyntum YY, Emerole GO. Influence of chloroquine treatment and *Plasmodium falciparum* malaria infection on some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense indices in humans. *Drug Chem Toxicol.* 2003; 26(1):59-71.
- De Moura Ferraz LR, Araújo dos Santos FL, de Ataíde Ferreira P, Lourenço Maia Junior RT, Atanazio Rosa T, Araújo Rolim L, Rolim-Neto PJ. Clinical, pharmacokinetic and technological aspects of the hydroxychloroquine sulfate. *IOSR J Pharm.* 2014; 04(11):53-64.

- Ficarra S, Misiti F, Russo A, Carelli-Alinovi C, Bellocco E, Barreca D, Lagana G, Leuzzi U, Toscano G, Giardina B, Galtieri A, Tellone E. Antiepileptic carbamazepine drug treatment induces alteration of membrane in red blood cells: possible positive effects on metabolism and oxidative stress. *Biochimie*. 2013; 95(4):833-41.
- Floris A, Piga M, Mangoni AA, Bortoluzzi A, Erre GL, Cauli A. Protective effects of hydroxychloroquine against accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm*. 2018; 2018:3424136.
- Frijhoff J., Winyard P.G., Zarkovic N., Davies S.S., Stocker R., Cheng D., Knight A.R., Taylor E.L., Oettrich J., Ruskovska T., Gasparovic A.C., Cuadrado A., Weber D., Poulsen H.E., Grune T., Schmidt H.H., Ghezzi P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144–70.
- Furst DE. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and chloroquine during treatment of rheumatic diseases. *Lupus*. 1996;5 Suppl 1:S11-5.
- Furst DE, Lindsley H, Baethge B, Botstein GR, Caldwell J, Dietz F, Ettlinger R, Golden HE, McLaughlin GE, Moreland LW, Roberts WN, Rooney TW, Rothschild B, Sack M, Sebba AI, Weisman M, Welch KE, Yocum D. Dose-loading with hydroxychloroquine improves the rate of response in early, active rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind six-week trial with eighteen-week extension. *Arthritis Rheum*. 1999;42(2):357–65.
- Giovanella F, Ferreira GK, De Prá SDT, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Scaini G, Gonçalves RC, Michels M, Galant LS, Longaretti LM, Dajori AL, Andrade VM, Dal-Pizzol F, Streck EL, De Souza RP. Effects of primaquine and chloroquine on oxidative stress parameters in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2015; 87(2 Suppl):1487-96
- Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, O'Valle F, López-Farré AJ, Algieri F, Gálvez J, Pérez-Vizcaino F, Sabio JM, Duarte J. Chronic Hydroxychloroquine Improves Endothelial Dysfunction and Protects Kidney in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *Hypertension*. 2014; 64(2):330-7.
- Gómez-Oliván LM, Miranda-Mendoza GD, Cabrera-Galeana PA, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, Neri-Cruz N, García-Medina S. Oxidative Stress Induced in Nurses by Exposure to Preparation and Handling of Antineoplastic Drugs in Mexican Hospitals: A Multicentric Study. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:858604.
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol*. 2015; 6:260-71.
- Görlach A, Dimova EY, Petry A, Martínez-Ruiz A, Hernansanz-Agustín P, Rolo AP, Palmeira CM, Kietzmann T. Reactive oxygen species, nutrition, hipoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol*. 2015; 6:372-85.

- Greig FH, Kennedy S, Spickett CM. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(2):266–80.
- Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *Int J Pharm Sci Res.* 2015;6(2):546-66.
- Hage MP, Al-Badri MR, Azar ST. A favorable effect of hydroxychloroquine on glucose and lipid metabolism beyond its anti-inflammatory role. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2014; 5(4):77-85.
- Harman D. Free Radical Theory of Aging: An Update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067:10–21.
- Hartman O, Kovanen PT, Lehtonen J, Eklund KK, Sinisalo J. Hydroxychloroquine for the prevention of recurrent cardiovascular events in myocardial infarction patients: rationale and design of the OXI trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2017; 3(2):92-7.
- Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature.* 1972; 235(5332):50-2.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006; 440(7086):944-8.
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem. J.* 1988; 256(1):205-12.
- Isik A, Koca SS, Ustundag B, Selek S. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med.* 2007; 212(2):133-41.
- Jiménez-Palop M. Antipalúdicos: actualización de su uso en enfermedades reumáticas. *Reumatol Clin.* 2006; 2(4):190-201.
- Kapitulnik J. Bilirubin: An Endogenous Product of Heme Degradation with Both Cytotoxic and Cytoprotective Properties. *Mol Pharmacol.* 2004; 66(4):773-9.
- Kaplan IV, Attaelmannan M, Levinson SS. Fibrinogen is an antioxidant that protects β -lipoproteins at physiological concentrations in a cell free system. *Atherosclerosis.* 2001; 158(2):455-63.
- Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhofer S, Radermacher KA, Janssen B, Gorlach A, Schmidt HH. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and

- molecular target in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(12):1391–1406.
- Kumar-Mishra S, Singh P, Rath SK. Protective Effect of Quercetin on Chloroquine-Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Mice. *Malar Res Treat*. 2013; 2013:141734.
- Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of Endosomal TLR Inhibition by Antimalarial Drugs and Imidazoquinolines. *J Immunol*. 2011; 186(8):4794–804.
- Lim HS, Im JS, Cho JY, Bae KS, Klein TA, Yeom JS, Kim TS, Choi JS, Jang IJ, Park JW (2009) Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and its clinical implications in chemoprophylaxis against malaria caused by *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(4):1468-75.
- Livertoux MH, Langrane P, Minn A. The superoxide production mediated by the redox cycling of xenobiotics in rat brain microsomes is dependent on their reduction potential. *Brain Res*. 1996; 725(2):207-16.
- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(7):1272-80.
- Mabalirajan U, Dinda AK, Kumar S, Roshan R, Gupta P, Sharma SK, Ghosh B. Mitochondrial structural changes and dysfunction are associated with experimental allergic asthma. *J Immunol*. 2008; 181(5):3540-8.
- Magwere T, Naik YS, Hasler JA. Effects of chloroquine treatment on antioxidant enzymes in rat liver and kidney. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(1-2): 321-7.
- Makoto H, Naomi Y, Hiroki O, Ebina K, Nampei A, Kawato Y, Shi K, Yoshikawa H, Nishimoto N, Hashimoto J. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Rheumatol Int*. 2012; 32(12):4041–45.
- Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*. 2014; 1(1): e29911.
- Mayor-Oxilia R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev Inst Med Trop*. 2010; 5(2):23-9.
- McCann SK, Roulston CL. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sci*. 2013; 3(2):561-98.

- McChesney EW, Banks WF, Sullivan DJ. Metabolism of chloroquine and hydroxychloroquine in albino and pigmented rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1965; 7(4):627-36.
- McLachlan AJ, Cutler DJ, Tett SE. Plasma protein binding of the enantiomers of hydroxychloroquine and metabolites. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993; 44(5):481-84.
- Melles RB, Marmor MF. The risk of toxic retinopathy in patients on long-term hydroxychloroquine therapy. *JAMA Ophthalmol.* 2014; 132(12):1453-60.
- Midha KK, Hubbard JW, Rawson MJ, McKay G, Schwede R. The roles of stereochemistry and partial areas in a parallel design study to assess the bioequivalence of two formulations of hydroxychloroquine: A drug with a very long half-life. *Eur J Pharm Sci.* 1996; 4(5):283-92.
- Mikhed Y, Görlach A, Knaus UG, Daiber A. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol.* 2015; 5:275-89.
- Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y. Antioxidant action of antimalarials. *Ann Rheum Dis.* 1986; 45(3):244–48.
- Monti D, Basilico N, Parapini S, Pasini E, Olliaro P, Taramelli D. Does chloroquine really act through oxidative stress? *FEBS Lett.* 2002; 522(1-3):3–5.
- Müller-Calleja N, Manukyan D, Canisius A, Strand D, Lackner KJ. Hydroxychloroquine Inhibits Proinflammatory Signalling Pathways by Targeting Endosomal NADPH Oxidase. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(5):891-7.
- Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *J Clin Cell Immunol.* 2012; 1(8):413.
- Olinescu RM, Kummerow FA. Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J Nutr Biochem.* 2001; 12(3):162–9.
- Ouyang Q, Huang Z, Wang Z, Chen X, Ni J, Lin L. Effects of pristane alone or combined with chloroquine on macrophage activation, oxidative stress, and th1/th2 skewness. *J Immunol Res.* 2014; 2014:613136.
- Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *Int J Nephrol.* 2012; 2012:465897.
- Pérez-Gastell PL, Pérez-de-Alejo JL. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 2000; 29(3):192-8.
- Rahman R, Murthi P, Singh H, Gurusinghe S, Mockler JC, Lim R, Wallace EM. The effects of hydroxychloroquine on endothelial dysfunction. *Pregnancy Hypertens.* 2016; 6(4):259-62.

- Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*. 2015; 23(5):231-69.
- Ramser B, Kokot A, Metze D, Weiss N, Luger TA, Böhm M. Hydroxychloroquine modulates metabolic activity and proliferation and induces autophagic cell death of human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(10):2419-26.
- Rathore G, Suthar M, Pareek A, Gupta R. Nutritional Antioxidants: A Battle for Better Health. *J Nat Pharm*. 2011; 2(1):2-14.
- Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Asthma; implications for mitochondria - targeted antioxidant therapeutics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2011; 4(3):429-56.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995; 9(7):526-33.
- Restrepo JF. Antimaláricos. En: Alarcón-Segovia D, Molina J (Eds.). *Tratado Hispanoamericano de Reumatología*. Primera edición. Schering-Plough, 2006; 311-20.
- Rezabakhsh A, Montazersaheb S, Nabat E, Hassanpour M, Montaseri A, Malekinejad H, Movassaghpour AA, Rahbarghazi R, Garjani A. Effect of hydroxychloroquine on oxidative/nitrosative status and angiogenesis in endothelial cells under high glucose condition. *Bioimpacts*. 2017; 7(4):219-26.
- Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*. 2014; 12(2):288–341.
- Rodriguez-Caruncho C, Bielsa-Marsol I. Antimalarials in dermatology: mechanism of action, indications, and side effects. *Actas Dermosifiliogr*. 2014; 105(3):243-52.
- Rosner B. Hypothesis testing: two sample inference. En: Taylor M, Seibert D (Eds.). *Fundamentals of biostatistics*. Séptima edición. Cengage Learning Inc., Boston, 2010: 269-326.
- Rynes RI. Antimalarial drugs. En: Kelley WN et al (Eds.). *Textbook of Rheumatology*. Quinta edición. W.B. Saunders, 1997: 747-58.
- Sagai M, Ichinose T. Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. *Life Sci*. 1980; 27(9):731-8.

- Saraswathy SD, Shyamala-Devi CS. Antitubercular drugs induced hepatic oxidative stress and ultrastructural changes in rats. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12(Suppl 1):85.
- Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem*. 2005; 38(11):981-6.
- Sardana K, Sinha S, Sachdeva S. Hydroxychloroquine in Dermatology and Beyond: Recent Update. *Indian Dermatol Online J*. 2020; 11(3):453–64.
- Sarin K, Kumar A, Prakash A, Sharma A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in *Plasmodium vivax* malaria before and after chloroquine treatment. *Indian J Malariol*. 1993; 30(3):127-33.
- Schroeder RL, Gerber JP. Chloroquine and hydroxychloroquine binding to melanin: Some possible consequences for pathologies. *Toxicol Rep*. 2014; 1:963-8.
- Semchyshyn HM, Lozinska LM, Miedzobrodzki J, Lushchak VI. Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Carbohydr Res*. 2011; 346(7):933–8.
- Shen H, Wu N, Wang Y, Zhao H, Zhang L, Li T, Zhao M. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Int Immunopharmacol*. 2017; 46:16–22.
- Siddiqi NJ, Alhomida AS. Status of hepatic oxidative stress and antioxidant defense systems during chloroquine treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice. *In Vivo*. 1999;13(6):547-50.
- Siddiqi NJ, Alhomida AS, Dutta GP, Pandey VC. Antagonist effect of chloroquine and tumor necrosis factor on hepatic oxidative stress and antioxidant defense in normal and *Plasmodium yoelii nigeriensis*-infected mice. *In Vivo*. 2002;16(1):67-70.
- Siddiqi NJ, Puri SK, Dutta GP, Maheshwari RK, Pandey VC. Studies on hepatic oxidative stress and antioxidant defense system during chloroquine/poly ICLC treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice. *Mol Cell Biochem*. 1999; 194(1-2):179-183.
- Slater AF, Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*. 1992; 355(6356):167-9.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 1996; 273(5271):59-63.

- Srivastava P, Puri SK, Dutta GP, Pandey VC. Status of oxidative stress and antioxidant defences during Plasmodium knowlesi infection and chloroquine treatment in Macaca mulatta. *Int J Parasitol.* 1992; 22(2):243-5.
- Stokkermans TJ, Falkowitz DM, Trichonas G. Chloroquine and hydroxychloroquine toxicity [Internet]. StatPearls Publishing, 2023. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537086/>
- Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 2003; 3(8):276-84.
- Sundelin SP, Terman A. Different effects of chloroquine and hydroxychloroquine on lysosomal function in cultured retinal pigment epithelial cells. *APMIS.* 2002;110(6):481–9.
- Tett SE, Cutler DJ, Day RO, Brown KF. A dose-ranging study of the pharmacokinetics of hydroxychloroquine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1988; 26(3):303-13.
- Tett SE, Cutler DJ, Day RO, Brown KF. Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1989; 27(6):771-9.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive Oxygen Species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.
- Toler SM. Oxidative Stress Plays an Important Role in the Pathogenesis of Drug-Induced Retinopathy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004; 229(7):607–15.
- Toler SM, Noe D, Sharma A. Selective enhancement of cellular oxidative stress by chloroquine: implications for the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurg Focus.* 2006; 21(6):E10.
- Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *Am J Epidemiol.* 2001; 154(4):348-56.
- Uzar E, Ozay R, Evliyaoglu O, Aktas A, Ulkay MB, Uyar ME, Ersoy A, Burakgazi AZ, Turkay C and Ilhan A. Hydroxycloquine-induced oxidative stress on sciatic nerve and muscle tissue of rats: A stereological and biochemical study. *Hum Exp Toxicol.* 2012; 31(10):1066-73.
- Venereo-Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002; 31(2):126-33.
- Vessoni AT, Quinet A, Andrade-Lima LCD, Martins DJ, Garcia CCM, Rocha CRR, Vieira DB, Menck CFM. Chloroquine-induced glioma cells death is associated with

- mitochondrial membrane potential loss, but not oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2016; 90:91–100.
- Viridis A, Tani C, Duranti E, Vagnani S, Carli L, Kühl AA, Solini A, Baldini C, Talarico R, Bombardieri S, Taddei S, Mosca M. Early treatment with hydroxychloroquine prevents the development of endothelial dysfunction in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17:277.
- Wallace DJ, Gudsoorkar VS, Weisman MH, Venuturupalli SR. New insights into mechanisms of therapeutic effects of antimalarial agents in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(9):522–33.
- Willis R, Seif A, McGwin G, Martinez-Martinez L, González E, Dang N, Papalardo E, Liu J, Vilá LM, Reveille JD, Alarcón GS, Pierangeli SS. Effect of hydroxychloroquine treatment on pro-inflammatory cytokines and disease activity in SLE patients: data from LUMINA (LXXV), a multiethnic US cohort. *Lupus*. 2012; 21(8):830–5.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998; 161(5):2524-32.
- Wolfe F, Marmor MF. Rates and predictors of hydroxychloroquine retinal toxicity in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010; 62(6):775-84.
- Wolff SP. Ferrous Ion Oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of Hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1994; 233:182-89.
- Yam JCS, Kwok AKH. Ocular toxicity of hydroxychloroquine. *Hong Kong Med J*. 2006; 12:294-304.