



**CONCENTRACIONES INTRAERITROCITARIAS DE GLUTATIÓN
REDUCIDO Y OXIDADO EN UNA MUESTRA DE SUJETOS SANOS DE LA
HABANA.**

**Gretel Riverón Forment¹, Jiovana Contreras Roura², Jacqueline Pérez Rodríguez³,
Lilia C. Marín Padrón⁴, Alina Concepción Álvarez⁵, Yaíma Zúñiga Rosales⁶.**

- 1. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ICBP"Victoria de Girón. Correo electrónico: ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6332-7113>.**
- 2. Laboratorio de Control de Calidad Químico-Físico y Mecánica. Empresa Laboratorios Farmacéuticos AICA. ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5299-798X>.**
- 3. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ID ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8291-0822>.**
- 4. Laboratorio Clínico. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ID ORCID <https://orcid.org/0000-0001-9819-4648>**
- 5. Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ICBP" Victoria de Girón". ID ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6161-5998>**
- 6. Centro Nacional de Genética Médica. ICBP "Victoria de Girón". Correo ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9483-9971>**

CORRESPONDENCIA: Laboratorio de Genética Bioquímica. Centro Nacional de Genética Médica. ICBP Victoria de Girón. Universidad Médica de la Habana. Ave 31 No. 3102 esq. 146. Cubanacán, Playa. La Habana. Teléfono: 537-2089991.

Email: gretel.riveron@infomed.sld.cu



RESUMEN

El glutatión reducido (GSH) participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular. Las concentraciones de GSH y su forma oxidada (GSSG) son indicadores de la funcionalidad celular. Son pocos los estudios que determinan los niveles de estos compuestos en sujetos sanos. Determinar las concentraciones eritrocitarias de GSH y GSSG en una muestra de sujetos sanos de La Habana. **Materiales y Métodos:** Las concentraciones de GSH y GSSG fueron determinadas en 71 muestras de sangre periférica procedentes de individuos aparentemente sanos de ambos géneros, en edades comprendidas entre 7 y 72 años. Se empleó un método de HPLC-UV para la cuantificación de estos compuestos. Las concentraciones obtenidas fueron de $1257,8 \pm 668 \mu\text{M}$ y $336 \pm 162,1 \mu\text{M}$ para el GSH y GSSG, respectivamente. La relación GSH/GSSG promedio fue de $5,4 \pm 4,9$. Los niveles de ambos compuestos no difieren entre los géneros. En el rango de edades estudiado no varían los niveles de GSH pero si se incrementan los de GSSG a medida que se incrementa la edad. Se determinaron las concentraciones intraeritrocitarias de GSH y GSSG así como el estado redox celular en sujetos sanos.

PALABRAS CLAVE: Glutatión, Glutatión oxidado, estado redox, individuos sanos, GSH/GSSG, HPLC.

INTRAERYTHROCYTE CONCENTRATIONS OF REDUCED AND OXIDIZED GLUTATHIONE IN A SAMPLE OF HEALTHY SUBJECTS FROM HAVANA.

ABSTRACT

Reduced glutathione (GSH) participates in essential aspects of cellular homeostasis. The concentrations of GSH and its oxidized form (GSSG) are indicators of cellular functionality. Few studies determine the concentrations of these compounds in healthy subjects. To determine the erythrocyte levels of GSH and GSSG in a sample of healthy



subjects from Havana. GSH and GSSG concentrations were determined in 71 peripheral blood samples from apparently healthy individuals of both sexes, aged between 7 and 72 years. A HPLC-UV method was used for the quantification of these compounds. Results: The concentrations obtained were $1257.8 \pm 668 \mu\text{M}$ and $336 \pm 162.1 \mu\text{M}$ for GSH and GSSG, respectively. The average GSH / GSSG ratio was 5.4 ± 4.9 . The levels of both compounds do not differ between the sexes. In the age range studied, GSH levels do not vary but GSSG levels do increase with age. Conclusions: The intraerythrocyte levels of GSH, GSSG and cellular redox status were determined in healthy subjects.

KEY WORDS: Glutathione, oxidized Glutathione, redox state, healthy individuals, GSH/GSSG, HPLC

INTRODUCCIÓN

El glutatión reducido (GSH) participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular, teniendo un papel central en la defensa contra el daño oxidativo. Cuando se produce la oxidación se forma el glutatión oxidado (GSSG), el que está conformado por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro. El GSH está presente mayormente en su forma reducida, por lo que, un aumento de la forma oxidada en las células y tejidos puede ser un marcador de afectación del estado redox celular. (1) Además de sus acciones como antioxidante, el GSH, participa en la

destoxificación de xenobióticos y agentes carcinógenos. Este tripéptido funciona como fuente y transportador de las cisteínas. Además, de servir como almacenamiento de este aminoácido en el compartimiento extracelular. Por otra parte, participa en la regulación de eventos celulares, tales como, la expresión y la síntesis de ADN, la síntesis de proteínas, en la proliferación celular y la apoptosis, la producción de citoquinas y en la respuesta inmune (2).

Las concentraciones de GSH, GSSG y su relación molar son indicadores de la funcionalidad celular y su alteración



está relacionada con varios procesos patológicos en el humano. La deficiencia de glutatión contribuye al estrés oxidativo (EO) el cual se describe que contribuye en la patogénesis de múltiples enfermedades, tales como, las neurodegenerativas entre las que se incluyen el Alzheimer y el Parkinson, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, enfermedades del hígado, la fibrosis quística, la anemia falciforme y el VIH/SIDA. (3)

Son pocos los estudios acerca de los niveles de estos compuestos en sujetos sanos, de ahí que el objetivo de la presente investigación fue determinar las concentraciones intraeritrocitarias del GSH, el GSSG, su relación molar y el estado redox celular en una muestra de individuos aparentemente sanos de la provincia Habana. Este constituiría el primer reporte en el país sobre los niveles de estos compuestos en sujetos sanos.

METODOLOGÍA

Recibido: 10/06/2021

Aprobado: 30/06/2021

Selección de la muestra

La muestra en estudio fue seleccionada a partir de 107 participantes en un proyecto de investigación aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), llevado a cabo por el Laboratorio de Genética Bioquímica en el período comprendido entre Febrero de 2017 a Octubre de 2018.

Una vez comprobado el estado de salud de todos los sujetos incluidos en la investigación, a través de la realización de estudios hematológicos (hemograma completo), de bioquímica sanguínea (pruebas de función hepática, glicemia y lipidograma) y marcadores de inflamación (proteína C reactiva y velocidad de eritrosedimentación). Teniendo en cuenta que estos parámetros fueran normales fueron seleccionados 71 sujetos. Este grupo de personas aparentemente sanas, estaba conformado por 44 féminas y 27 hombres, en edades comprendidas entre los 7 años y 72 años de edad.

Métodos



Para la realización del estudio se emplearon 2 ml de sangre periférica con EDTA como anticoagulante. A partir de la cual se obtuvo el lisado de eritrocitos el que se preparó de acuerdo a lo reportado por Vilar y cols (4). Posteriormente, se realizó el pre-tratamiento del lisado celular, el que consistió en la desproteización con ácido perclórico al 10% (5:1, v/v). Estos procedimientos se llevaron a cabo dentro de las dos horas posteriores a la extracción.

Condiciones cromatográficas

Las concentraciones intraeritrocitarias de GSH y GSSG fueron medidas simultáneamente empleando el método cromatográfico descrito por Lipsa y colaboradores en el 2015. (5) Al que se le introdujeron ligeras modificaciones para la determinación intraeritrocitaria de estos compuestos. La técnica consiste en un método isocrático de HPLC-UV en fase reversa con detección ultravioleta a 215 nm. El programa *LabSolution* (Shimadzu, Japón) fue utilizado para la adquisición

y procesamiento de los datos cromatográficos.

Para la separación cromatográfica de los compuestos se utilizó columna de fase reversa LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm) y una pre-columna 4x4 mm (LiChroCART®), se trabajó a un flujo de 1 mL/min y a 30 °C de temperatura. La fase móvil consistió en agua/acetonitrilo (96/4, v/v), ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y 12 mg/ml de perclorato de sodio. El volumen de inyección fue de 20 µl de la muestra desproteizada. El tiempo de corrida fue de 5,5 minutos. Los tiempos de retención fueron de 2,2 min y de 3,4 min para el GSH y el GSSG, respectivamente.

Las concentraciones del GSH y el GSSG se estimaron mediante curvas de calibración en el rango de concentraciones de 62,5 a 1000 µM para el GSH y de 25 a 1000 µM para el GSSG. Posteriormente a partir de los niveles de estos compuestos se calculó la relación GSH/GSSG y se determinó el estado redox celular mediante la

ecuación de Nerst, modificada por Jones y col, 2002 (6):

$$E_{\text{GSH/GSSG}} = E_{\text{GSH/GSSG}}^0 + 0,013 \ln \frac{c(\text{GSSG})}{c^2(\text{GSH})}$$

, donde el $E_{\text{GSH/GSSG}}^0 = -264 \text{ mV}$

Análisis estadísticos

Para determinar la distribución de las variables se utilizó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y para la homogeneidad de varianzas la prueba de Levene. Los resultados se expresaron como medias +/- desviación estándar y se calcularon los intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Se utilizó la prueba paramétrica *t-student* para evaluar si el género influye en los resultados. Para la correlación se empleó la prueba de *Spearman*. La significancia estadística se estableció a

partir de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATISTICA versión 8.0 para Windows.

Aspectos éticos

En el desarrollo de la presente investigación se tuvieron en cuenta los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2013.

RESULTADOS

En la muestra de sujetos sanos estudiada las variables, GSH y GSSG, mostraron una distribución normal, según aparece reflejado en la figura 1.

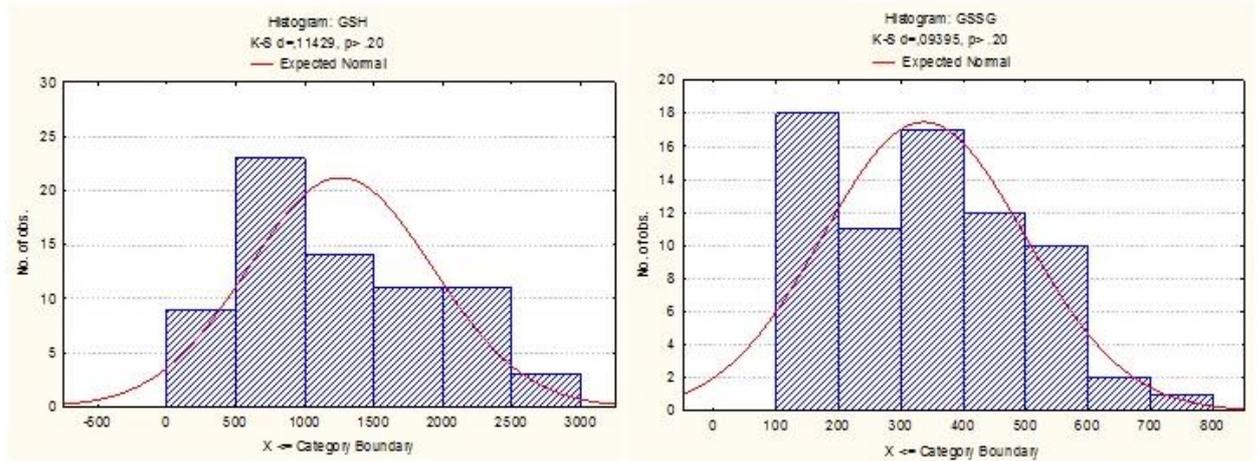


Figura 1. Distribución de las variables GSH y GSSG en la muestra en estudio. Prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$)

Las concentraciones intraeritrocitarias de GSH, de GSSG, la relación molar GSH/GSSG y el estado redox celular a

nivel del eritrocito se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones intraeritrocitarias de glutatión reducido y oxidado, su relación molar y estado redox celular en una muestra de sujetos sanos (n=71).

<i>Marcadores</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación estándar (SD)</i>	<i>Intervalos de Confianza (IC 95%)</i>
GSH (μM)	1257,9	668	1099,7-1416,1
GSSG (μM)	336,7	162	298,3- 375,1
GSH/GSSG	5,4	4,9	4,2- 6,6
Estado redox (mV)	-346,21	-5,22	-350,5 a -341,9

Como se aprecia en la figura 2, los niveles de GSH y GSSG no difieren en

relación con el género ($p=0,410$ y $p=0,640$).

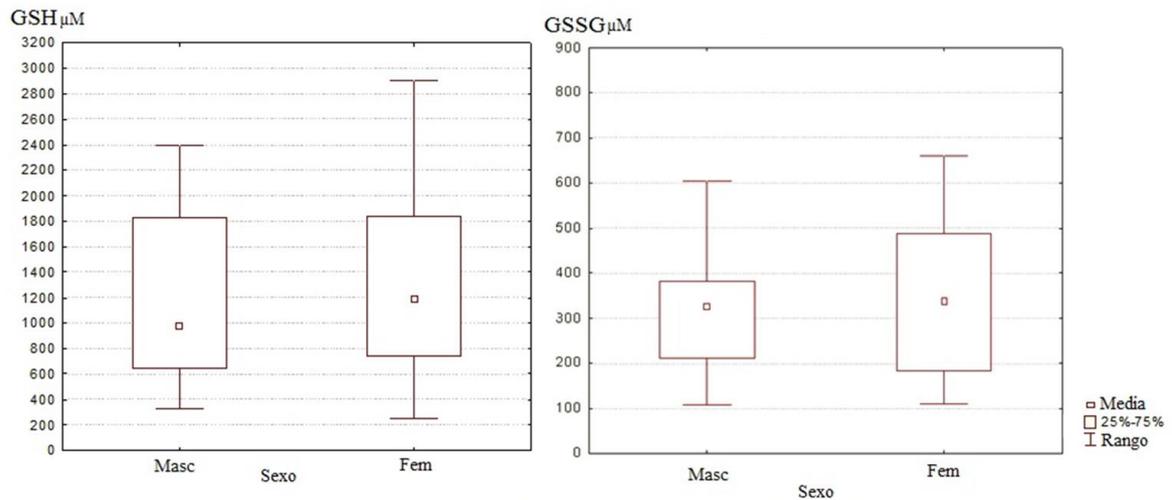


Figura 2. Concentraciones de GSH y GSSG en el grupo de sujetos sanos de acuerdo al género.

Mientras que, en el rango de edades analizado si se observó que los niveles del GSSG se incrementan a medida que avanza la edad ($R=0,24$; $p=0,036$), no

así para el GSH ($R= -0,06$; $p=0,5$) (ver figura 3).

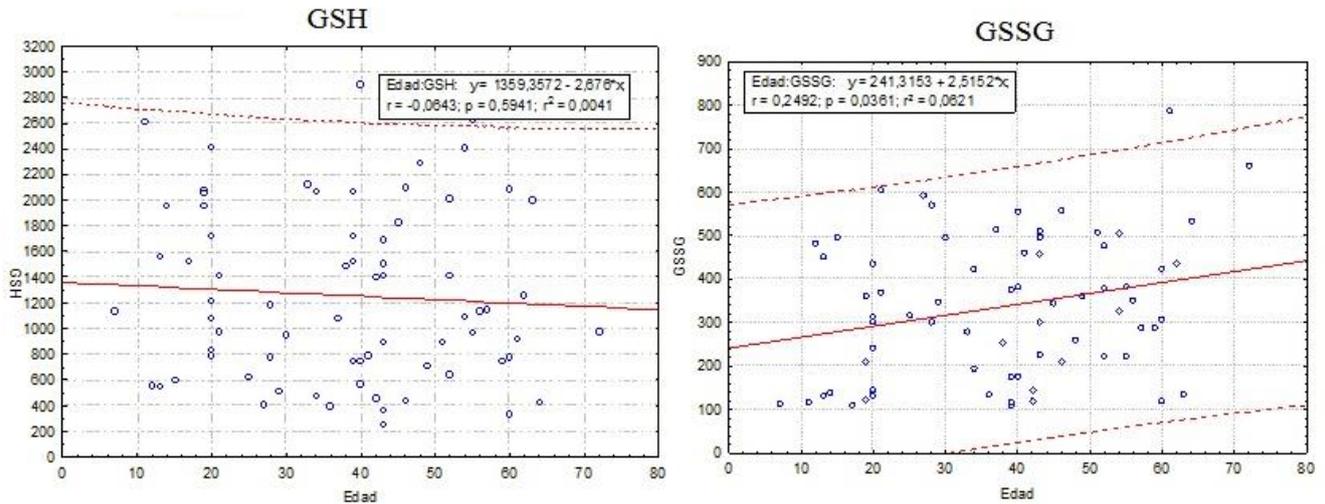


Figura 3. Niveles de GSH y GSSG en el grupo de sujetos sanos en relación con la edad.

DISCUSIÓN

El eritrocito es una célula altamente especializada y dada su función de transportar el oxígeno posee una potente protección antioxidante. (7) El GSH es el principal antioxidante no enzimático en estas células, siendo su principal función eliminar directamente especies reactivas derivadas del oxígeno. En este contexto, los niveles intracelulares de este tripéptido, van a depender de su síntesis, su transporte, su reciclaje y su utilización. (8, 9)

Teniendo en cuenta la importancia del GSH en el mantenimiento del estado redox celular, varios estudios se han enfocado en determinar los niveles de GSH y GSSG en sujetos sanos (8-12). Sin embargo, en relación con las concentraciones reportadas de estos compuestos, diversas son las metodologías empleadas para su medición, así como, las muestras biológicas utilizadas. Lo que unido a las diferentes formas de expresar la concentración y los factores de corrección empleados hace difícil la



comparación entre los diferentes reportes que aparecen en la literatura científica.

Basado en lo anterior, las concentraciones intraeritrocitarias del GSH reportadas en el presente estudio son comparables con las obtenidas por Erden-Inol y col en el 2002 (10) y por van't Erve y col en el 2013 (13). Este último grupo de investigación señala que de manera general los niveles intraeritrocitarios promedios de GSH son de 1,4 mmol/L, tanto en gemelos como en individuos no relacionados, aparentemente sanos. Estos autores plantean que las diferencias intra-individuales que reportan otras investigaciones podrían estar genéticamente determinadas. (13)

En el caso del GSSG, las concentraciones reportadas muestran un amplio rango de variación. (8-12) Los valores reportados en el presente estudio, son comparables con los obtenidos por van't Erve y col (13), estos autores explican el hecho de encontrar valores de concentración

superiores a los reportados en otros estudios a la utilización del ácido perclórico como agente desproteinizante, lo que coincide con el empleado en el presente estudio.

Cuando se analiza la influencia de factores como la edad, se obtuvo que el GSSG se incrementa con la edad, mientras que, no se encontró asociación entre el GSH y la edad en el rango de edades estudiado. Estos hallazgos están en correspondencia con reportes previos donde se señala la relación descrita entre las alteraciones de la homeostasis del GSH con el envejecimiento (10, 14). En este sentido, se describe que estas afectaciones en los niveles de GSH y GSSG con el avance de la edad, puede conducir a alteraciones en las respuestas inmunológicas ante las infecciones virales y a enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (EO) como el cáncer y los trastornos neurodegenerativos. (10, 15)

En cuanto al género, en la muestra seleccionada, el género femenino fue predominante, sin embargo, no se



encuentran diferencias en los marcadores según el género. En estudios precedentes no se reportan diferencias en estos marcadores atendiendo al género (10, 14), de manera coincidente con lo reportado en este estudio.

El par redox GSH/GSSG es el más abundante en el eritrocito. Se plantea que en los individuos sanos aproximadamente el 90% del GSH esté en su estado reducido. (16) Por lo que, una disminución en los valores de esta razón, podría ser indicativo de la depleción del GSH ya sea por su utilización para contrarrestar el aumento de procesos oxidativos o en la detoxificación de xenobióticos. En condiciones de EO aumenta el consumo de GSH, aumenta la salida de GSSG y por tanto esta razón disminuye. (16) De ahí la importancia de conocer la relación molar en sujetos aparentemente sanos, valores que podrían ser utilizados para contrastarlos con los de pacientes con posibles alteraciones en el estado redox celular. Sobre todo porque es

muy amplia la variación de los valores reportados, tanto para la relación molar como para el estado redox celular. Lo cual está dado por la dependencia que tienen estos valores a las concentraciones determinadas para cada uno de los componentes de este par redox y de la expresión utilizada en cada investigación, la que adicionalmente puede variar entre los diferentes estudios donde se reporta. (10, 13)

Finalmente, fueron determinadas las concentraciones intraeritrocitarias del GSH y GSSG así como el estado redox celular eritrocitario. A partir de estos datos, en futuras investigaciones se podrán utilizar estos resultados para contrastarlos con los obtenidos en pacientes con diversas patologías, así como, para la evaluación de la respuesta de las opciones terapéuticas que sean utilizadas en la atención de los mismos, lo que redundará en el incremento de la calidad de la atención médica ofrecida a los pacientes cubanos.



REFERENCIAS

1. Ezgu F. Inborn Errors of Metabolism. *Adv Clin Chem* 2016;73:195-250. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.001. Epub 2016 Jan 23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26975974/>
2. Ferguson GD, Bridge WJ. The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol* 2019 Jun; 24: 101171.
3. Teskey G, Abraham R, Cao R, Gyurjian K, Islamoglu H, Lucero M, Martinez A, Paredes E, Salaiz O, Robinson B, Venketaraman V. Glutathione as a marker for Human disease. *Avances in clínicas Chemistry* 2018; 87 Chapter 5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342710/>
4. Vilar E, Martinez Y, Vega H, Riveron G, Arus E, Calzadilla L, Garcia AY, Abreu MR, González L. Antioxidant and immunomodulatory effects of Viusid in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2010;16:2638-47.
5. Lipsa D, Cacho C, Leva P, Barrero-Moreno J, Aguar P. Development of a HPLC-UV method for simultaneous determination of intracellular glutathione species in human cells. *J Anal Bioanal Tech* 2015;6:259. Doi 10.4172/2155-9872.10000259.
6. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Method enzymol* 2002;348:93-112.
7. Maurya PK, Kumar P, Chandra P. Biomarker of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World J Methodol* 2015 Dec 26;5(4):216-22.



8. Kalpravidh RW, Tangjnidee T, Hatairaktham S, Charoenski R, Panichkul N, Siritanaratkul N, Fucharoen S. Glutathione redox system in b-thalassemia/HbE patient. *Scien World J* 2013;2013:7. <https://doi.org/10.1155/2013/543973>. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816076/>
9. Trevisan M, Browne R, Ran M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001;154(4):348-56.
10. Erden-Inal M, Sunal E, Kanbak G. Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* 2002;Mar 20(1):61-6. doi:10.1002/cbf.937.
11. Veglia F, Cighetti G, De Franceschi M, Zingaro L, Boccotti L, Tremoli E, Cavalca V. Age-and-gender-related oxidative status in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers* 2006;11(6):563-73. doi:10.1080/13547500600898623.
12. Hernanz A, Fernández-Vivanco C, Montiel JJ, Vázquez F, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* 2000;67(11):1317-24.
13. van't Erve TJ, Wagner BA, Ryckman KK, Raife TJ, Beuttner GR. The concentration of glutathione in human erithrocytes is a heritable trait. *Free Radic Biol Med* 2013 Dec 65. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.002.
14. Weber D, Stuetz W, Toussaint O, Debaq-Chainiaux F, Dolle ME, Jansen E, *et al.* Associations between specific redox biomarkers and age in a



- large european cohort: the
MARK-AGE project. *Oxid Med
Cell Longev*
2017;2017:1401452.
doi:10.1155/2017/1401452.
15. Silvagno F, Vernone A,
Pescarmona GP. The role of
glutathione in protecting against
the severe inflammatory
response triggered by COVID-
19. *Antioxidants*
2020;9:624.doi:10.3390/antiox9
070624.
16. Kuhn V, Diederich L, Stevensen
K, Kramer CM, Luckstadt W,
Pankain C, *et al.* Red blood cell
function and dysfunction: Redox
regulation, nitric oxide,