

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOQUÍMICA

Enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura

TESIS Para optar el Título Profesional de: QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES:

MARCO ANTONIO ADRIAZOLA JOKADA

PAOLA LUISA OLIVERA PAZOS

ASESOR: Q.F. HAYDÉE ZÚÑIGA CÁCERES

LIMA – PERÚ 2005

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
SUMMARY . .	7
I. INTRODUCCIÓN . .	9
II. GENERALIDADES .	11
2.1 RADICALES LIBRES . .	11
2.1.1 Producción de Radicales Libres: .	11
2.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs): .	12
2.1.3 Daños Producidos por las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs): .	15
2.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA .	16
2.2.1 Enfermedades relacionadas con la Peroxidación Lipídica: .	18
2.3 MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO . .	18
2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos: . .	19
2.3.2 Antioxidantes No Enzimáticos: . .	21
2.4 ESTRÉS OXIDATIVO . .	22
2.4.1 Estrés Oxidativo e Hipoxia en la Altura: . .	23
2.4.2. Mecanismos Fisiológicos de Adaptación a la Altura: .	23
III. PARTE EXPERIMENTAL . .	25
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .	25
3.2 APARATOS Y MATERIALES .	26
3.2.1 Equipo de Laboratorio: .	26
3.2.2 Material de Laboratorio: . .	26
3.3 MÉTODOS .	27
3.3.1 Determinación de Superóxido Dismutasa (SOD).- .	27
3.3.2. Determinación de Glutation Peroxidasa (GPx).- . .	29
3.3.3 Determinación de Catalasa (CAT).- . .	30

3.3.4. Determinación de Malondialdehído (MDA).- .	31
3.3.5. Determinación de Hemoglobina (Hb).- .	33
3.3.6. Determinación de Hematocrito (Hto).- . .	34
IV. RESULTADOS .	35
V. DISCUSIÓN . .	43
CONCLUSIONES . .	47
RECOMENDACIONES .	49
BIBLIOGRAFÍA .	51

Dedicatoria A Dios, que es la luz que guía nuestras vidas. Paola y Marco A mis padres Félix y Paula, por el inmenso amor y apoyo constante, por sus valiosos y sabios consejos que me ayudan a afrontar obstáculos durante mi vida y por darme confianza para cumplir mis metas. A mi hermano Gabriel, a quien quiero mucho y agradezco por su apoyo y ayuda incondicional que me brinda en todo momento. A Marco, por su amistad, paciencia y colaboración en el presente trabajo. Paola Luisa A mis padres Jorge y Lucy, con inmenso amor, admiración y gratitud, por su ejemplo de vida, indesmayable apoyo y esfuerzos para verme salir adelante. A mis hermanos Jorge y Katty, por su constancia en impulsarme en lograr mis metas. A Paola Luisa, por su incondicional apoyo, paciencia y comprensión en la realización de este trabajo. Marco Antonio

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Q.F. Elizabeth Carranza y Dra. Q.F. Haydée Zúñiga, por su dedicada labor docente, su empeño en la investigación y en especial por su invaluable asesoría, orientación, conducción y apoyo en la realización del presente trabajo.

Nuestro profundo agradecimiento a la Presidenta del Jurado Calificador Dra. Q.F. Elizabeth Gonzales L. y a los señores Miembros del Jurado Calificador, Dra. Q.F. Elena Benavides, Dr. Q.F. Gustavo Guerra y Dr. Q.f. Juan Parreño, por sus valiosas sugerencias y consejos para la mejor presentación de este trabajo.

Nuestro especial agradecimiento a todas aquellas personas que colaboraron voluntariamente en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se determinó los niveles de las enzimas antioxidantes: Glutation Peroxidasa (GPx), Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT); y la concentración de Malondialdehído (MDA) como un indicador de la peroxidación lipídica, en eritrocitos de 60 personas aparentemente sanas: 30 residentes de la altura (Cerro de Pasco, 4340 m.s.n.m.) y 30 residentes de nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los niveles eritrocitarios de Glutation peroxidasa de los nativos de altura ($66,86 \pm 8,97$ U GPx / g Hb) y los de nivel del mar ($37,78 \pm 8,87$ U GPx / g Hb), ($p < 0,001$). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para la Superóxido dismutasa de la altura y de nivel del mar: $4140,56 \pm 1147,69$ U SOD / g Hb vs. $4104,35 \pm 1917,9$ U SOD / g Hb, respectivamente. La actividad de la enzima Catalasa fue menor en los sujetos de altura ($275,27 \pm 44,21$ k CAT / g Hb) en relación con los de nivel del mar ($414,29 \pm 81,07$ k CAT / g Hb), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Los niveles de Malondialdehído en los nativos de altura también fueron menores ($8,60 \pm 1,91$ nMol MDA / g Hb) que los obtenidos a nivel del mar ($11,16 \pm 1,55$ nMol MDA / g Hb), ($p < 0,001$).

Palabras claves: Superóxido dismutasa (SOD), glutacion peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), peroxidación lipídica, hipoxia y estrés oxidativo en la altura.

SUMMARY

It was determined the levels of the antioxidants enzymes: Glutathione Peroxidase (GPx), Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT); and the concentration of Malondialdehyde (MDA) like an indicator of the lipid peroxidation in erythrocytes of 60 seemingly healthy people: 30 residents at the high altitude (Cerro de Pasco, 4340 m above sea level) and 30 residents at sea level (Lima, 150 m above sea level).

It was found significant difference estadistic between erythrocyte levels of Glutathione peroxidase higher in the native of high altitude ($66,86 \pm 8,97$ U GPx / g Hb) and people living at sea level ($37,78 \pm 8,87$ U GPx / g Hb), ($p < 0,001$). It was not found significant difference estadistic between the values obtained of Superoxide dismutase at high altitude and sea level: $4140,56 \pm 1147,69$ U SOD / g Hb vs. $4104,35 \pm 1917,9$ U SOD / g Hb, respectively. The Catalase enzyme activity was smaller in subjects of high altitude ($275,27 \pm 44,21$ k CAT / g Hb) that in subjects at sea level ($414,29 \pm 81,07$ k CAT / g Hb), this difference was significant ($p < 0,001$). The levels of Malondialdehyde in the native of high altitude were also smaller ($8,60 \pm 1,91$ nMol MDA / g Hb) that in those obtained at sea level ($11,16 \pm 1,55$ nMol MDA / g Hb), ($p < 0,001$).

Key words: Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), lipid Peroxidation, hypoxia and oxidative stress at high altitude.

I. INTRODUCCIÓN

Los organismos superiores, como el ser humano, no pueden existir sin el oxígeno. Este elemento desempeña una función importante durante la respiración celular, pero también constituye el punto de partida para la formación de metabolitos denominados Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), los cuales constituyen los radicales libres de mayor importancia biológica porque son capaces de reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, y otras moléculas para alterar su estructura y producir daño tisular. Ante esto, las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), Glutathion Peroxidasa (GPx) y Catalasa (CAT) constituyen la primera línea de defensa antioxidante del organismo frente al ataque de los radicales libres. Otra enzima que interviene en este sistema de defensa es la Glutathion reductasa (GRd), que cataliza la reducción del glutathion oxidado a glutathion reducido, el cual será utilizado por la GPx para la reducción de peróxidos y lipoperóxidos, que son especies reactivas de oxígeno. Además existen otras moléculas con actividad antioxidante como: vitamina E, ácido ascórbico (vitamina A), albúmina, ceruloplasmina, ácido úrico, entre otras. Bajo ciertas condiciones estos sistemas se encuentran deprimidos o son sobrepasados por la excesiva producción de dichas especies reactivas, provocando el denominado "Estrés Oxidativo".⁽¹⁾⁽²⁾

Estamos a principios del siglo XXI y los Andes son la cadena montañosa más habitada del planeta. En ninguna parte encontramos las densidades poblacionales de Perú y Bolivia, donde millones de hombres se han establecido a más de 3500 m.s.n.m. Estudios previos han demostrado que el nativo de las grandes alturas presenta características diferentes al habitante de zonas ubicadas a nivel del mar. La hipoxia de las grandes alturas produce un incremento fisiológico de la hemoglobina como

mecanismo de adaptación, esto condicionaría la producción de radicales libres como consecuencia de la autooxidación de la hemoglobina. Este hecho aunado a otros factores hacen del hombre peruano un elemento de estudio para explicar los mecanismos que se manifiestan en la altura respecto a su fisiología y bioquímica. Sin embargo, los problemas de salud de la altura no han sido aún totalmente esclarecidos.⁽³⁾⁽⁴⁾

Considerando lo mencionado, el propósito del presente trabajo es evaluar los niveles de las enzimas Superóxido Dismutasa, Glutathion Peroxidasa y Catalasa como antioxidantes eritrocitarios en sujetos nativos de altura (Cerro de Pasco, 4340 m.s.n.m.) y comparar los resultados con sujetos residentes a nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.). Adicionalmente evaluaremos la concentración de Malondialdehído (MDA) como un indicador de la peroxidación lipídica en ambos grupos de estudio.

Con el presente estudio se pretende aportar al mejor conocimiento de los mecanismos de defensa de las células de los habitantes de las grandes alturas ante el estrés oxidativo.

II. GENERALIDADES

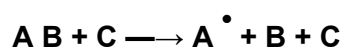
2.1 RADICALES LIBRES

Se considera como Radical Libre a cualquier molécula, fragmento molecular o átomo que en su estructura atómica presenta uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. Esta configuración lo hace muy inestable, de vida efímera y extraordinariamente reactivo, es decir con una enorme capacidad para reaccionar con cualquier otra sustancia captando y cediendo electrones para estabilizar su carga eléctrica. Los radicales libres pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros.(5)(6)(7)

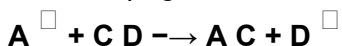
2.1.1 Producción de Radicales Libres:

Las reacciones producidas por radicales libres suelen ser procesos en cadena, en los cuales se pueden distinguir tres etapas: Iniciación, Propagación y Terminación.

En las reacciones de *Iniciación*, un radical se forma a partir de una especie química estable no radical:



En la *Propagación*, un radical libre reacciona con una molécula estable:



En la *Terminación* dos radicales libres comparten sus electrones desapareados y originan un producto estable.



Los radicales libres pueden ser producidos por procesos fisiológicos normales o por la influencia de especies exógenas.

Entre las fuentes endógenas de radicales libres tenemos:

- La **mitocondria** constituye la fuente principal de radicales libres. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar ATP. Una consecuencia directa de este proceso de fosforilación oxidativa es que, entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres.⁽⁸⁾

- Otras fuentes son los **peroxisomas**, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno.

- Los **leucocitos** polimorfonucleares constituyen una fuente importante cuando se activan por diversas proteínas que actúan sobre ellos (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de radicales libres. Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios.⁽⁹⁾

- La enzima **xantina deshidrogenasa** predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas formando ácido úrico. Cuando pasa a la forma **xantina oxidasa** (isquemia, estimulación del Ca^{2+} , etc.) genera el anión superóxido.⁽¹⁰⁾

También existen fuentes exógenas de radicales libres como xenobióticos, humo del cigarro, drogas como la adriamicina, radiaciones ultravioleta, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro y cobre y compuestos fenólicos), traumatismos, procesos inflamatorios, ejercicios extenuantes, estados de hiperoxia, entre otros.⁽⁷⁾

2.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno (EROs):

De todos los radicales, resultan de gran interés las especies reactivas derivadas del oxígeno, debido a la estructura birradicálica de esta molécula y al gran número de procesos en los que puede verse involucrado.

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a agua a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de especies de oxígeno parcialmente reducidas, denominadas también especies reactivas de oxígeno (EROs), oxi-radicales o intermediarios de la reducción del oxígeno. Últimamente prefieren llamarse EROs, para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical.⁽²⁾⁽¹¹⁾

Las EROs se originan a través de una serie de transferencias monoeléctricas:



Como podemos ver, la reducción monoeléctrica del oxígeno da lugar al radical anión superóxido, la dielectrónica al peróxido de hidrógeno y la trielectrónica al radical hidroxilo. Las especies reactivas explicadas hasta ahora no son las únicas, existen otras como el peroxil (ROO^\bullet) y el alcoxil (RO^\bullet). También existe el Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el óxido nítrico (NO^\bullet), el anión peroxinitrito (OONO^-) y el ión hipoclorito (OCl^-) formado a partir del H_2O_2 por la enzima mieloperoxidasa.⁽²⁾⁽¹²⁾

2.1.2.1. Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$)

Llamado también Oxígeno Singlete. Es una forma excitada de la molécula de oxígeno diatómico y constituye un potente agente oxidante capaz de combinarse con múltiples moléculas con las que no reacciona el oxígeno en su estado basal.⁽¹³⁾

Se genera en o sobre la piel por transferencia de energía desde otra molécula reactiva, por reacciones fotoquímicas o por reacciones de fotosensibilización.⁽¹⁴⁾

La inversión de los electrones de los orbitales del oxígeno molecular origina dos formas de oxígeno singlete: el *oxígeno singlete delta* ($^1\Delta_g \text{O}_2$) que, debido a su larga vida media, es el de mayor importancia biológica, y el *oxígeno singlete sigma* ($^1\Sigma_g^+$), más reactivo que el anterior pero de corta vida media porque rápidamente decae al estado delta, antes de que tenga tiempo de reaccionar con algo.⁽¹⁵⁾

2.1.2.2. Anión Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido. Ésta es una especie química que en comparación con otras EROs, no es altamente reactiva y no puede reaccionar directamente con las biomoléculas, además es inestable en soluciones acuosas ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación, la cual se acelera por acción de la enzima Superóxido Dismutasa.

(Reacción 1)⁽¹³⁾



La reacción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con ión ferroso, descubierto por Fenton en 1894, es una de las más antiguas, mejor conocidas y que da origen a la formación del radical hidroxilo (Reacción 2).⁽¹⁶⁾ En 1934, Haber y Weiss descubrieron que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 pueden reaccionar en presencia de iones férricos como catalizador y también dar lugar a la producción de radical hidroxilo (Reacción 3).



El superóxido se forma en el eritrocito por la autoxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (se calcula que alrededor del 3% de hemoglobina se autoxida al día en los eritrocitos humanos), en otros tejidos se forma por la acción de enzimas como la citocromo P450 reductasa y xantina oxidasa.⁽¹⁶⁾

2.1.2.3. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno no tiene electrones desapareados y por lo tanto no es un radical. La reducción univalente del anión superóxido origina el ión peróxido, que formado a pH fisiológico se protoniza inmediatamente dando lugar al peróxido de hidrógeno. También se genera a partir de la reacción de dismutación, catalizada por la enzima Superóxido Dismutasa (Ver Reacción 1).⁽¹³⁾

Es una especie reactiva de oxígeno relativamente estable, no es muy tóxica y puede atravesar la capa de lípidos en las membranas celulares debido a la ausencia de carga eléctrica en su molécula y así difundir grandes distancias, de esta manera también está involucrada en la propagación, durante la injuria celular, en varias condiciones patológicas. La concentración normal de peróxido de hidrógeno en plasma humano es de 4 a 5 μM y se incrementa bajo condiciones inflamatorias.⁽¹⁷⁾

2.1.2.4. Radical Hidroxilo (OH^{\bullet})

De todas las especies reactivas del oxígeno, sin duda, la más dañina es el radical hidroxilo. Tiene una vida media muy corta, del orden de 10^{-10} a 10^{-11} segundos. Es un agente muy oxidante y su alta reactividad le permite interactuar con todo tipo de sustratos que se encuentren en su entorno inmediato: glúcidos, aminoácidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, permitiendo que se formen radicales libres de aquellas moléculas con las que reaccionó.

Se forma principalmente a partir de peróxido de hidrógeno y superóxido a través de las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. La realización de este mecanismo es posible *in vivo* por la gran difusión de Fe^{2+} en los tejidos. Asimismo, la acción de las radiaciones ionizantes tiene efectos perjudiciales, puesto que producen la fisión de enlaces O-H en el

agua, originando también radicales hidroxilo.⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾

2.1.3 Daños Producidos por las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs):

Las Especies Reactivas de Oxígeno participan en los mecanismos de fagocitosis y en algunas reacciones enzimáticas, constituyendo un elemento básico en la defensa antimicrobiana y antitumoral. Sin embargo, los efectos nocivos son mayores.⁽¹⁸⁾

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades.⁽¹¹⁾

Debido a la alta inestabilidad atómica de los radicales libres, éstos colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Son numerosas las consecuencias vinculadas al daño producido por los radicales libres, incluso la hipótesis del proceso de envejecimiento se fortalece al focalizarla en las mitocondrias, por la acción continua de los radicales libres y la acumulación selectiva de daños oxidativos en las moléculas especialmente sensibles (Teoría del envejecimiento mitocondrial y celular).⁽¹⁹⁾ Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las acciones de los radicales libres:

- Las **proteínas** son modificadas de diferente manera por las EROs. Debido a la reactividad con moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoácidas mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado una inhibición de las enzimas que dependen de estos aminoácidos para presentar actividad. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares.⁽¹⁵⁾

En relación con los **lípidos**, por las características de la oxidación lipídica por los radicales libres, se trata de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina.⁽⁷⁾⁽¹⁵⁾ Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis.⁽¹⁵⁾⁽²⁰⁾ El malondialdehído, que es un producto final de la peroxidación de ácidos grasos, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más alteradas.⁽¹⁵⁾

- Los **ácidos nucleicos** también pueden ser afectados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el OH^- . Las modificaciones químicas de los nucleótidos

provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la muerte celular.⁽¹⁵⁾

- Los **carbohidratos** son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo (OH^\cdot) para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.⁽¹⁵⁾

2.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos son un grupo heterogéneo de componentes que tienen varias funciones importantes en el cuerpo tales como: fuente eficiente de energía, constituyente de membranas celulares y tejido nervioso, aislante térmico y eléctrico y también actúan como hormonas locales.⁽²¹⁾

El mecanismo de peroxidación lipídica inducida por radicales libres fue establecido en la década del 40 por Farmer y sus colaboradores trabajando en los laboratorios de investigación en el British Rubber Producers Association. Después, en los años 50, la relevancia de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos y medicina empezó a ser explorada.⁽²²⁾⁽²³⁾ La peroxidación lipídica en membranas biológicas ha sido considerada como uno de los mayores mecanismos de injuria celular en organismos aeróbicos sujetos a estrés oxidativo.⁽²⁴⁾

Se denomina Peroxidación Lipídica (o Lipoperoxidación) al proceso de oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFASs – polyunsaturated fatty acids) son particularmente susceptibles a la peroxidación porque poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que le confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el OH^\cdot le sustraiga un átomo de hidrógeno. Se trata de una reacción en cadena o autocatalítica, es decir que, una vez comenzada, continúa desarrollándose por sí misma.⁽²⁵⁾ Por lo tanto, el proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

La **Iniciación** es cuando la unión C-H de los PUFAs sufre la abstracción del hidrógeno del doble enlace (hidrógeno alílico), lo que genera un radical lipídico. Teniendo el átomo de hidrógeno un solo electrón, la sustracción de hidrógeno del grupo metileno produce un radical ácido graso (L^\cdot) al dejar un electrón desapareado en el carbono. El inicio se expresa en la siguiente reacción:



Donde: L H = PUFA y R[□] = Radical libre derivado de oxígeno.

El radical carbonilo resultante (L[•]) sufre un reordenamiento molecular originando un dieno conjugado, y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peroxilo (LOO[•])



El radical peroxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina (LH), la cual puede ser otro ácido graso insaturado, formándose así un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical lipídico (L[•]), entrando la peroxidación en una fase de **Propagación** :



El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de oxígeno, composición de ácidos grasos, relación de lípido-proteína y presencia de antioxidantes.

Los hidroperóxidos son los productos primarios de la lipoperoxidación y en condiciones fisiológicas son relativamente estables, pero su descomposición puede estar estimulada por exposición a metales de transición como sales de cobre o de hierro.(25)(26)(27) Los grupos[•]OOH de los hidroperóxidos (LOOH), localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, llevan a una distorsión del espacio hidrofóbico y a una pérdida de la función biológica de las membranas.

La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a la fase de **Terminación** cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos como el malondialdehído (MDA), que es un indicador de la lipoperoxidación. Cabe señalar que a su vez, en las reacciones de terminación, se da la formación del oxígeno singlete (¹O₂) como producto secundario de la lipoperoxidación.(18)

La mayoría de métodos de laboratorio, para determinar el daño por los radicales libres o cuantificar el estrés oxidativo, se basan en la medición de los productos oxidados de los PUFAs. Estos métodos incluyen dosaje de MDA, estudio de dienos conjugados, la medición de energía lumínica (fotoemisión que producen las moléculas terminales de la peroxidación lipídica).⁽²⁵⁾

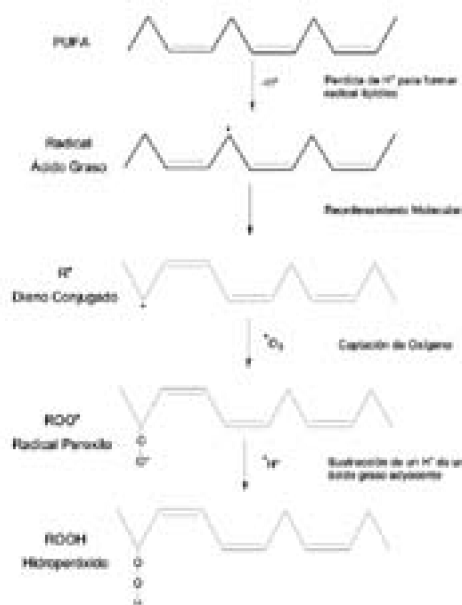


Figura 1: Mecanismo de la Peroxidación Lipídica

2.2.1 Enfermedades relacionadas con la Peroxidación Lipídica:

Es interesante y crucial mencionar que, el actual interés por el estudio de la acción de los radicales libres y de la peroxidación lipídica sobre membranas biológicas y sobre distintas estructuras celulares se debe a una mayor evidencia del rol que juegan en diferentes patologías, como por ejemplo: cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, catarata ocular; además se indica a la lipoperoxidación como responsable de la degeneración de neuronas causando algunas patologías cerebrales como: isquemia cerebral, Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. ⁽¹⁴⁾⁽²³⁾

2.3 MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan especies reactivas de oxígeno. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen. A estas defensas se les denomina **ANTIOXIDANTES** y se considera como tal a toda sustancia que, presente a bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato. El término "sustrato oxidable" incluye todo tipo de biomoléculas: Glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. ⁽⁵⁾⁽²³⁾

El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por acción de otros antioxidantes. No

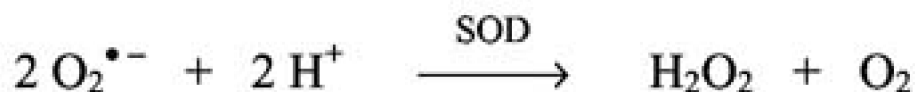
todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres de oxígeno. (28)(29)

Esencialmente, las defensas antioxidantes se dividen en dos grandes grupos: los enzimáticos y los no enzimáticos:

2.3.1 Antioxidantes Enzimáticos:

2.3.1.1 Superóxido Dismutasa (SOD).- (Superóxido oxidorreductasa, E.C. 1.15.1.1.)

Son un grupo de metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aeróbios, aerotolerantes y algunos anaeróbios obligados. (30) Catalizan la dismutación del anión superóxido originando peróxido de hidrógeno. (21)(31)(32)



El peróxido de hidrógeno generado por la acción de la enzima, es eliminado por la Catalasa (CAT) y/o la Glutacion Peroxidasa (GPx). (33) En eucariotas existen tres formas de SOD, dependiendo del metal del centro catalítico. (12)

Cu-Zn-SOD: Contiene grupos prostéticos Cobre y Zinc; se encuentra en el citosol de las células eucarióticas. Está constituida por dos subunidades similares que contienen cada uno un equivalente de Cu^{2+} y Zn^{2+} . (21)(34)

Mn-SOD: Contiene el grupo prostético Manganeso; se encuentra en la mitocondria y protege las proteínas de membrana y ADN del anión superóxido generado como resultado de la cadena respiratoria. (30)(34)

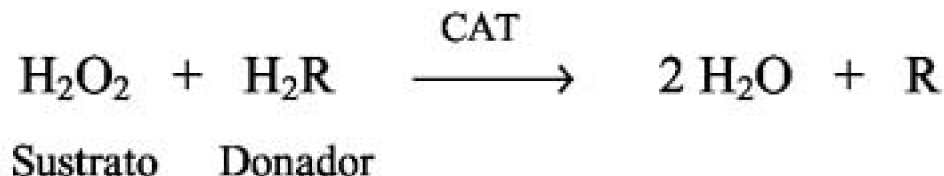
EC-SOD: Contiene Cu^{2+} y Zn^{2+} al igual que la Cu-Zn-SOD citosólica; se ubica en el medio extracelular, la cual es necesaria para la defensa contra numerosas fuentes extracelulares de O_2^{\bullet} . (33)

2.3.1.2 Catalasa (CAT)

(Peróxido de Hidrógeno Oxidorreductasa, E.C. 1.11.1.6.)

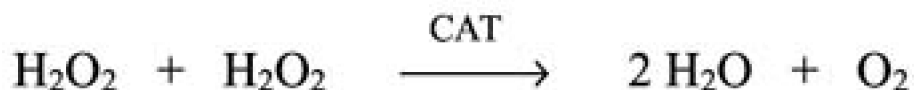
Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido, ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica; consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX. (35)

La catalasa está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. Ambas se pueden representar por la ecuación:



La reacción general entraña la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por un donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado.

En la reacción catalítica, el donador es otra molécula de H_2O_2 . Esta reacción sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica.



En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donantes de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, formol y formaldehído. Esta reacción se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrámeros.⁽¹¹⁾

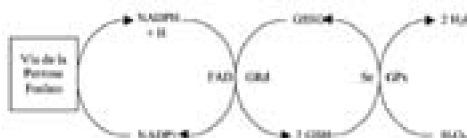
2.3.1.3 Glutation Peroxidasa (GPx)

(E.C. 1.11.1.9.)

Es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (L-OOH), utilizando el glutation reducido (GSH)⁽²¹⁾⁽³⁶⁾



El glutation oxidado es reducido por la Glutation Reductasa (GRd) que utiliza NADPH (proveniente de la vía pentosa fosfato en el eritrocito) como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH / GSSG.⁽¹²⁾⁽³⁷⁾ (Figura 2).



La Glutation Peroxidasa (GPx) y la Glutation Reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx / GRd), y la Catalasa de otro (SOD /

CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas.⁽³⁶⁾

Existen al menos tres formas de Glutathion Peroxidasa selenio dependiente: una forma intracelular o celular (GPx-C), una extracelular o plasmática (GPx-P) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH), que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, posee diferencias estructurales. La GPx-C y la GPx-P son enzimas tetraméricas; están compuestas por cuatro subunidades idénticas entre sí y cada una de éstas contiene un átomo de Selenio unido covalentemente a una molécula de cisteína. La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la GPx-C es diferente a la secuencia de la GPx-P. Las subunidades por separado no presentan actividad catalítica; sin embargo, la GPx-PH es una enzima monomérica que también posee un átomo de Selenio y presenta actividad catalítica.⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

La GPx-C tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por los lipoperóxidos, en tanto la GPx-P tiene una afinidad semejante para los dos sustratos. La GPx-C y la GPx-P utilizan como sustratos al H_2O_2 y a los lipoperóxidos; sin embargo, no son capaces de utilizar los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH) que son los sustratos principales para la GPx-PH.⁽³⁸⁾⁽⁴⁰⁾

2.3.2 Antioxidantes No Enzimáticos:

Los antioxidantes no enzimáticos están presentes en la dieta ingerida por los seres vivos, sobre todo en las frutas y verduras. Tienen como principales características que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula (cazadores estequiométricos), sólo actúan a concentraciones elevadas y tienen un papel despreciable frente a los antioxidantes enzimáticos.⁽¹²⁾

Vitamina E (α - tocoferol).- Impide las reacciones en cadena producidas por radicales peróxido durante la peroxidación lipídica (etapa de propagación) El α -tocóferol dona un átomo de hidrógeno al radical, produciéndose el radical α -tocóferoxil (α -TO \cdot), el cual es lo suficientemente estable como para no continuar las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, siendo removido del ciclo al reaccionar con otro radical peroxil formando productos inactivos.⁽¹²⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾



Vitamina C (Ácido Ascórbico).- Es una molécula de pequeño tamaño e hidrosoluble, por lo que no es efectiva frente a la peroxidación lipídica. Puede actuar como pro o antioxidante.⁽¹²⁾ Así, puede autooxidarse, especialmente en presencia de metales, para producir EROs. Bajo la forma de ascorbato presenta una actividad dual sobre la peroxidación lipídica, ya que dependiendo de su concentración puede inhibirla o

incrementarla. A bajas concentraciones promueve la peroxidación lipídica, esto ya que puede reducir al Fe^{3+} a Fe^{2+} favoreciendo la misma.

La vitamina C, por su carácter reductor, también es capaz de reaccionar rápidamente con el $O_2^{\bullet -}$ (anión superóxido) y con el OH (radical hidroxilo), en ambos casos se oxida a dihidroascorbato. También es captor del oxígeno singlete y del ión hipoclorito.⁽²⁾

Se ha encontrado también que el ascorbato puede reaccionar con especies intermedias de la oxidación del α -tocoferol (como es el caso del α -tocoferoxil) reduciéndolas a su estado inicial, ayudando así a mantener los niveles tisulares de la vitamina E.⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾

Otros Antioxidantes.-

- **β Caroteno (Pro Vitamina A).**- Además de su actividad antioxidante, es muy eficiente eliminando al oxígeno singlete, debido a que posee un alto sistema de dobles enlaces conjugados, aunque sólo tiene importancia en regiones con baja tensión de oxígeno.⁽⁴⁾

- **Ceruloplasmina**.- Proteína circulante portadora de cobre; oxida al ión Fe^{2+} a Fe^{3+} por lo que inhibe el proceso lipoperoxidativo y la reacción de Fenton dependiente de Fe^{2+} .⁽¹²⁾

- **Transferrina**.- Son proteínas circulantes transportadoras de hierro. Se encargan de enlazar al hierro deteniendo o retardando su participación en la reacción de Haber-Weiss y en la peroxidación lipídica.⁽¹³⁾

- **Glutation (GSH)**.- Además de captar el H_2O_2 como sustrato de la Glutation Peroxidasa, también capta al $O_2^{\bullet -}$ y al OH.⁽²⁾

2.4 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis de óxido-reducción intracelular, es decir el desbalance entre la producción y la remoción de EROs (prooxidantes y antioxidantes), que conlleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el daño celular.⁽²⁾⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾

El estrés oxidativo puede provenir de:

- Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante.

- Un incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de estos cambios ocasiona la enfermedad.⁽²⁾⁽⁴³⁾

2.4.1 Estrés Oxidativo e Hipoxia en la Altura:

La vida en las grandes alturas somete al organismo a reiteradas descompensaciones. Junto con la disminución de la temperatura y de la humedad del ambiente, la exposición a una mayor radiación UV e ionizante, el factor más agobiante lo representa el descenso de la presión barométrica y por ende, la disminución del oxígeno.

Este fenómeno se conoce como hipoxia hipobárica y cuya expresión equivale a la disminución del aporte de oxígeno en el aire inspirado, causando a su vez la caída de la presión parcial del oxígeno en arterias con una menor saturación de la hemoglobina y como consecuencia final, provocando una hipoxia tisular. Ante esto, el organismo activa una serie de mecanismos que conducen a compensar la hipoxemia (menor contenido de oxígeno en la sangre). Estos mecanismos han sido adecuadamente desarrollados en los nativos de altura. Es así, como el hombre peruano ha vivido por generaciones en zonas alto-andinas y que en la actualidad se encuentre adaptado a la altura.⁽³⁾⁽⁴⁵⁾

2.4.2. Mecanismos Fisiológicos de Adaptación a la Altura:

Los mecanismos de adaptación a la vida en la altura incluyen el aumento de la ventilación pulmonar, la capacidad de difusión, la vascularización, la capacidad de las células para usar el oxígeno al aumentar el número de mitocondrias que son el sitio de las reacciones oxidantes; de la hemoglobina que facilita el desplazamiento del oxígeno en los tejidos; del contenido tisular de la citocromo oxidasa y de la actividad de otros sistemas enzimáticos oxidativos celulares.⁽³⁾⁽⁴⁶⁾

Uno de los parámetros más estudiados es el aumento de eritrocitos y la hemoglobina que fisiológicamente están elevados como respuesta adaptativa.⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾ Existe una tasa elevada de metahemoglobina, la cual desplaza la curva de disociación de la hemoglobina hacia la izquierda aumentando la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y disminuyendo la oxidación de los tejidos, sin embargo hay una glicólisis acelerada que a su vez favorece el aumento de ATP; 2,3-bi-fosfoglicerato (2,3-DPG) y GSH que desplazan la curva de disociación hacia la derecha, estableciendo un equilibrio que aumenta la oxigenación de los tejidos. El 2,3-DPG es importante en la regulación de la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno.⁽²¹⁾

El aumento de hemoglobina, por consiguiente, involucraría la formación de especies reactivas de oxígeno mediante dos procesos:

Producción de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton.

Formación de radicales peroxil y alcoxil a partir de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos. Los grupos Hem de la hemoglobina pueden inducir a la peroxidación lipídica debido a la habilidad del hierro dentro del Hem para interactuar con los lipoperóxidos localizados en el medio hidrofóbico de la membrana.⁽⁴⁾⁽⁴¹⁾

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El estudio se realizó siguiendo las normas de Helsinki, en 60 sujetos aparentemente sanos repartidos en dos grupos experimentales: 30 estudiantes universitarios residentes en la altura (Cerro de Pasco, 4340 m.s.n.m.) y 30 estudiantes universitarios residentes de nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.), cuyas edades están comprendidas entre 20 y 30 años.

Extracción y Tratamiento de la Muestra:

La toma de muestras se realizó en estado de ayuno, extrayéndose sangre de la vena media cubital del antebrazo, en cantidad aproximada de 6 mL, colocándose en tubos limpios y secos con heparina sódica como anticoagulante.

Se separó: 1 mL de la muestra para la determinación de Hematocrito y Hemoglobina, y el resto se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para la obtención del paquete eritrocitario. Luego se tomó 2 mL de eritrocitos y se procedió a lavarlos por tres veces con cloruro de sodio al 0,9%. Los eritrocitos lavados fueron distribuidos de la siguiente manera: 1 mL para la determinación de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y CAT) y 1 mL para la determinación de Malondialdehído (MDA).

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio del Centro de Investigación

“Instituto Nacional de Biología Andina” en Lima.

3.2 APARATOS Y MATERIALES

3.2.1 Equipo de Laboratorio:

- Espectrofotómetro Coleman Junior[®] II Modelo 6/20
 - Espectrofotómetro Hewlett Packard UV/Vis
 - Centrífuga IES
 - Balanza Analítica
 - Cocinilla

ESPECTROFOMETRO HEWLETT PACKARD UV/VIS



3.2.2 Material de Laboratorio:

- Pipeta Sahli
 - Tubos de ensayo 10 x 75 mm
 - Pipetas volumétricas y graduadas
 - Micropipetas

- Termómetro
- Cronómetro
- Fiolas
- Beakers
- Gradillas

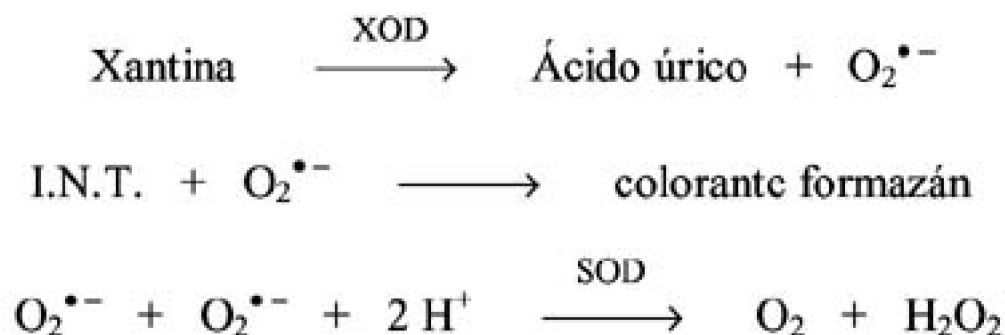
3.3 MÉTODOS

3.3.1 Determinación de Superóxido Dismutasa (SOD).-

Método empleado basado en el trabajo de Mc Cord y Fridovich. Se utilizó el kit de análisis RANSOD.

Fundamento.- La función de la superóxido dismutasa -(SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) producido durante el proceso oxidativo energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de esta reacción.



Reactivos.-

- Sustrato mixto (Xantina + I.N.T.)
- Solución diluyente Buffer Fosfato 0,01 mol pH 7,0
- Solución Estándar (Patrón)
- Xantina Oxidasa

Procedimiento.-

Longitud de onda : 505 nm

Cubeta : 1 cm de espesor

Temperatura : 37 °C

	Blanco	Estándar	Muestra
Muestra*	-	-	0,05 mL
Estándar	-	0,05 mL	-
Diluyente	0,05 MI	-	-
Sustrato	0,40 MI	0,40 mL	0,40 mL
Mezclar bien			
Xantina Oxidasa	0,06 MI	0,06 mL	0,06 mL

Mezclar y leer la absorbancia al cabo de 30 segundos y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Leer las absorbancias cada 30 segundos hasta cumplir los 3 minutos.

* **Procesamiento de la muestra:** Se tomó 10 μ L de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Luego se toma 0,1 mL del lisado y se diluye con 2 mL de 0,01 mol/L buffer fosfato pH 7,0.

Curva Patrón:

Estándar	Concentración	Volumen de Soluciones Patrón	Volumen de Solución Diluyente
S ₆	4,90 U/mL	Patrón neto	-
S ₅	2,45 U/mL	5 mL de S ₆	5 mL
S ₄	1,23 U/mL	5 mL de S ₅	5 mL
S ₃	0,61 U/mL	5 mL de S ₄	5 mL
S ₂	0,18 U/mL	3 mL de S ₃	6 mL
S ₁	0	-	5 mL

Cálculos.-

$$\frac{\text{Abs final} - \text{Abs inicial}}{3} = \Delta \text{ Abs/min de estándar o de muestra}$$

Índice de muestra diluyente (Índice S₁) = Índice de reacción sin inhibir = 100%

Todos los índices, tanto de los patrones como de las muestras diluidas, deben ser convertidos en porcentaje del índice del blanco y sustraídos del 100% para obtener el porcentaje de inhibición.

Porcentaje de inhibición estándar o muestra:

$$100 - \frac{(\Delta \text{ Abs estándar o muestra/min} \times 100)}{\Delta \text{ Abs S}_1/\text{min}}$$

Se representa el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a \log_{10} (concentración del estándar en unidades SOD / mL).

Utilizar el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón.

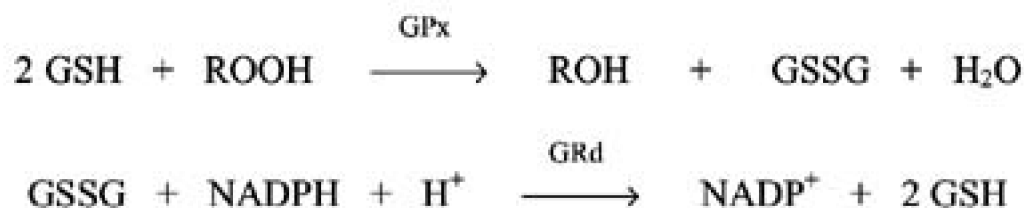
Conversión a unidades de SOD / g de Hemoglobina:

$$\frac{\text{U SOD / mL}}{\text{g Hb / mL}} = \text{U SOD / g Hb}$$

3.3.2. Determinación de Glutation Peroxidasa (GPx).-

Este método está basado en el trabajo de Plagia y Valentine. Se utilizó el kit de análisis RANSEL.

Fundamento.- La glutacion peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutation (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. El glutation oxidado (GSSG) en presencia de glutacion reductasa (GRd) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP^+ . Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm.



Reactivos.-

Reactivo (Glutation + Glutation Reductasa)

Buffer Fosfato 0,05 mol/L pH 7,2

Hidróxido de Cumeno 0,18 mmol/L

Diluyente

Procedimiento.-

Longitud de onda : 340 nm

Cubeta : 1 cm de espesor

Temperatura : 37 °C

	Blanco	Muestra
Muestra*	-	0,01 mL
Agua bidestilada	0,01 mL	-
Reactivo (Sustrato)	0,50 mL	0,50 mL
Cumeno	0,04 mL	0,04 mL

Mezclar y leer la absorbancia inicial de la muestra y del blanco al cabo de un minuto y empezar a cronometrar simultáneamente. Leer con intervalo de 30 segundos hasta cumplir los tres minutos. Restar el valor obtenido para el blanco de la muestra.

* **Procesamiento de la muestra:** Se tomó 25 µL de eritrocitos lavados y fueron hemolizados con 0,50 mL de diluyente. Luego se toma 10 µL de esta solución para el análisis.

Cálculos.-

Se calcula primero las Unidades de enzima por Litro de hemolizado (U GPx/L):

$$U \text{ GPx/L} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{Mol/Mol})}{\epsilon \times V_r}$$

Donde:

$\Delta \text{ Abs/min}$: Variación de absorbancia por minuto

ϵ : Coeficiente de extinción molar de Glutation Peroxidasa

(a 340 nm = $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t : Volumen total

V_r : Volumen del hemolizado (volumen real)

Luego se relaciona las unidades de enzima por litro de hemolizado con el valor de gramos de hemoglobina por litro de hemolizado, obteniéndose las Unidades de GPx por gramo de hemoglobina (U GPx/g Hb):

$$\frac{U \text{ GPx} / L}{g \text{ Hb} / L} = U \text{ GPx} / g \text{ Hb}$$

3.3.3 Determinación de Catalasa (CAT).-

Este método está basado en el trabajo de Hugo Aebi (*Catalase in vitro*, 1984)

Fundamento.- En el rango ultravioleta el peróxido de hidrógeno muestra un continuo incremento en absorción con disminución de la longitud de onda. La descomposición del peróxido de hidrógeno puede ser seguida directamente por la disminución en la absorbancia a 240 nm. La diferencia en absorbancia por unidad de tiempo es una medida

de la actividad de la catalasa.⁽⁴⁹⁾

Reactivos.-

- Buffer Fosfato 50 mM pH 7,0
- Solución de Peróxido de Hidrógeno 30 mM. Se diluye 0,34 mL de peróxido de hidrógeno al 30% con buffer fosfato para 100 mL

Procedimiento.-

Longitud de onda : 240 nm

Cubeta : 1 cm de espesor

Temperatura : Ambiente (25 °C)

	Blanco	Muestra
Muestra diluida*	-	0,01 mL
Agua bidestilada	0,01 mL	-
Solución de H ₂ O ₂	3 mL	3 mL

* **Procesamiento de la muestra:** Se tomó 25 µL de eritrocitos lavados, que se hemolizaron con 2 mL de agua destilada. Luego se tomó 10 µL del lisado para el análisis.

Cálculos.-

$$K_{CAT}/g \text{ Hb} = \frac{2,3}{\Delta t} \times \frac{V_T}{V_R} \times \frac{1}{\text{Hb/L}} \times \log \left(\frac{A_1}{A_2} \right) \times 1000$$

Donde:

$K_{CAT}/g \text{ Hb}$: Actividad de la enzima CAT expresada por gramo de hemoglobina

Δt : Variación de tiempo

g Hb/L : gramos de hemoglobina por litro

V_T : Volumen total

V_R : Volumen del hemolizado (volumen real)

A_1 : Absorbancia a 240 nm en tiempo 0

A_2 : Absorbancia a 240 nm en tiempo 15 seg.

3.3.4. Determinación de Malondialdehído (MDA).-

Fundamento.- La determinación de MDA se basa en la medición espectrofotométrica de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico con modificaciones descritas en el trabajo de Hong, Yeh, Chang y Hu⁽⁵⁰⁾, adicionando NaOH para separar el MDA unido a las proteínas. Las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico fueron calculadas usando el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Reactivos .-

- Hidróxido de sodio 12,5 N
- Butil hidroxi tolueno (BHT) 0,2%
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 18%
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%

Procedimiento.-

Longitud de onda : 532 nm

Cubeta : 1 cm de espesor

Temperatura : 60°C y 95°C

Muestra (hemolizado)*	0.500 mL
BHT 0.2%	0,040 mL
NaOH 12.5 N	0,020 mL
Incubar por 30 min a 60° C	
TCA 18%	1.20 mL
Baño de hielo por 10 min	
Centrifugar (3500 rpm por 10 min)	
Sobrenadante	1 mL
TBA 0.6%	0.500 ml
Incubar por 30 min a 95°C	
Leer a 532 nm	

* **Procesamiento de la Muestra:** Se tomó 1 mL de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Se dejó reposar en baño de hielo por 15 minutos. Luego se tomó 0,5 mL para la determinación de MDA. El resto del hemolizado se utilizó para determinar los gramos de hemoglobina por litro.

Cálculos.-

$$MDA = \frac{Abs_{MP} - Abs_{BL}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_R} \times \frac{1}{g\ Hb/L} \times 10^9 \mu mol$$

Donde:

Abs_{MP} : Absorbancia de la muestra problema

Abs_{BL} : Absorbancia del blanco

ε : Coeficiente de extinción de MDA (1,56 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹)

V_R : Volumen real

g Hb/L : gramos de hemoglobina por litro

3.3.5. Determinación de Hemoglobina (Hb).-

Para la determinación de la hemoglobina se utilizó el método de la cianometahemoglobina. Se utilizó el kit Valtek.

Fundamento.- Los eritrocitos son lisados por acción de un agente tensioactivo presente en el reactivo, liberando su contenido de hemoglobina en la solución.

La hemoglobina liberada es oxidada por el ferricianuro, produciendo metahemoglobina que reacciona con el cianuro, dando cianometahemoglobina, compuesto estable cuyo pico máximo de absorción es a 540 nm, siendo la intensidad de color obtenido directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra.

Reactivos.-

- Solución estándar: Metahemoglobina disuelta en reactivo de Drabkin.
- Reactivo de Hemoglobina:
 - Ferricianuro de potasio
 - Cianuro de potasio
 - Sterox
 - Buffer y estabilizantes no reactivos

Procedimiento.-

a) *Preparación del reactivo de trabajo:* Diluir el reactivo 1:10 con agua destilada antes de usarlo. La solución estándar se provee lista para su uso, medir su absorbancia directamente contra el blanco reactivo.

b) Colocar con *pipeta Sahli* en tres tubos de lectura marcados B (blanco), St (estándar) y MP (muestra problema). Trabajando por duplicado, colocar:

	B	St	MP
Sangre	-	-	0,020 mL
Estándar	-	0,020 mL	-
Reactivo	5 mL	5 mL	5 mL

c) Mezclar y dejar en reposo 10 minutos a temperatura ambiente.

d) Leer las absorbancias 540 nm llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo.

Cálculos.-

Hemoglobina (g/dL) = Factor x Absorbancia MP

Donde:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración St}}{\text{Absorbancia St}}$$

3.3.6. Determinación de Hematocrito (Hto).-

Para la determinación del hematocrito se utilizó el método del microcapilar.

Fundamento.- Los eritrocitos son separados del resto de componentes de la sangre mediante centrifugación a 2000 rpm y posteriormente la altura que ocupan los eritrocitos sedimentados es leído en una escala graduada, obteniéndose los porcentajes.

IV. RESULTADOS

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura y de nivel del mar se obtuvieron los siguientes resultados:

- Las Tablas N° 1, 2 y 3, muestran los valores hallados para las enzimas: Superóxido Dismutasa, Glutation Peroxidasa y Catalasa respectivamente; determinado en eritrocitos de sujetos residentes de nivel del mar (Lima, 150 m.s.n.m.) y en altura (Cerro de Pasco, 4340 m.s.n.m.).
- Los Gráficos N° 1, 2 y 3 muestran los valores promedio para cada una de las enzimas antioxidantes en ambos grupos de estudio.
- La Tabla N° 4 muestra los valores de Malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en eritrocitos de sujetos residentes de altura y de nivel del mar.
- El Gráfico N° 4 muestra el valor promedio de los niveles de MDA para cada grupo de estudio.
- La Tabla N° 5 muestra los parámetros estadísticos de SOD, GPx, CAT y MDA en ambos grupos de estudio.

Superóxido Dismutasa:

Los valores medios de la enzima SOD en altura fueron ligeramente mayores (4140,56 \pm 1147,69 U SOD / g Hb) que a nivel del mar (4104,35 \pm 1917,9 U SOD / g Hb), sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Glutation Peroxidasa

Los valores medios de la enzima GPx en la altura fueron mayores ($66,86 \pm 8,97$ U GPx / g Hb) que a nivel del mar ($37,78 \pm 8,87$ U GPx / g Hb), ($p < 0,001$).

Catalasa

Los valores medios de la actividad de la enzima CAT en altura fueron menores ($275,27 \pm 44,21$ k CAT / g Hb) que a nivel del mar ($414,29 \pm 81,07$ k CAT / g Hb), ($p < 0,001$).

Malondialdehído

Los resultados de los valores medios de MDA en altura fueron menores ($8,60 \pm 1,91$ η mol MDA / g Hb) que los obtenidos a nivel del mar ($11,16 \pm 1,55$ η mol MDA / g Hb), ($p < 0,001$).

TABLA N° 1: NIVELES DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN ERITROCITOS DE SUJETOS NATIVOS EN ALTURA Y A NIVEL DEL MAR

N° de Muestra	SOD (U / g Hb)	
	Nivel del Mar	Altura
01	4226,47	4638,97
02	3180,04	4814,87
03	4154,63	5582,65
04	5021,37	3456,70
05	1848,05	5360,87
06	3527,03	5701,74
07	2593,79	3684,09
08	2964,77	4181,25
09	1709,73	5114,92
10	3405,69	4600,45
11	2254,45	6726,64
12	2158,36	5675,41
13	3649,12	3134,40
14	2042,22	3783,05
15	1850,85	3211,81
16	2936,31	2633,58
17	1638,50	6178,24
18	6368,22	2730,29
19	2422,66	4111,17
20	7591,45	2941,19
21	8431,75	4915,81
22	6755,89	3724,57
23	4440,89	2850,83
24	4004,80	2855,78
25	5494,02	3300,14
26	5704,18	3789,71
27	6848,39	3267,61
28	6627,80	3145,47
29	4098,32	5069,08
30	5180,78	3035,53
PROMEDIO	4104,35	4140,56

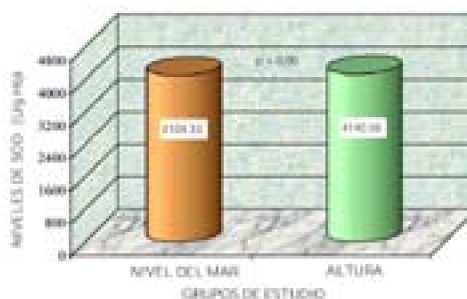


GRÁFICO N° 1: VALOR PROMEDIO DE LOS NIVELES DE SUPEROXIDO DISMUTASA POR GRUPO DE ESTUDIO

TABLA N° 2: NIVELES DE LA ENZIMA GLUTATION PEROXIDASA EN ERITROCITOS DE SUJETOS NATIVOS EN ALTURA Y A NIVEL DEL MAR

N° de Muestra	GPx (U / g Hb)	
	Nivel del Mar	Altura
01	47,11	75,23
02	41,77	70,13
03	23,70	74,16
04	55,38	61,34
05	35,61	62,85
06	33,58	63,44
07	29,71	52,78
08	29,28	74,61
09	38,07	62,01
10	28,64	73,93
11	40,47	51,37
12	33,17	70,41
13	40,62	74,76
14	44,40	64,13
15	28,83	81,85
16	46,98	68,20
17	34,83	87,72
18	34,22	68,50
19	30,62	79,57
20	37,15	78,13
21	27,53	64,57
22	51,71	65,12
23	29,95	58,45
24	30,30	60,12
25	40,46	56,05
26	39,20	62,72
27	56,01	52,46
28	34,19	58,66
29	55,82	65,33
30	34,08	67,10
PROMEDIO	37,78	66,86



GRÁFICO N° 2: VALOR PROMEDIO DE LOS NIVELES DE GLUTATION PEROXIDASA POR GRUPO DE ESTUDIO

TABLA N° 3: NIVELES DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA EN ERITROCITOS DE SUJETOS NATIVOS EN ALTURA Y A NIVEL DEL MAR

Enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura

N° de Muestra	CAT (k / g Hb)	
	Nivel del Mar	Altura
01	437,94	252,14
02	291,94	285,20
03	382,08	212,35
04	508,14	240,24
05	315,52	198,33
06	427,43	233,52
07	504,09	187,22
08	474,60	285,25
09	486,20	322,08
10	380,53	282,67
11	198,20	258,06
12	505,40	294,18
13	379,72	251,35
14	410,97	300,20
15	471,24	214,43
16	350,08	242,45
17	541,52	359,41
18	348,65	307,95
19	468,73	279,71
20	428,18	312,83
21	510,72	301,47
22	406,25	317,34
23	540,27	233,49
24	339,03	270,15
25	441,49	263,50
26	454,59	324,84
27	397,40	339,91
28	369,71	341,66
29	327,88	300,30
30	330,20	245,88
PROMEDIO	414,29	275,27

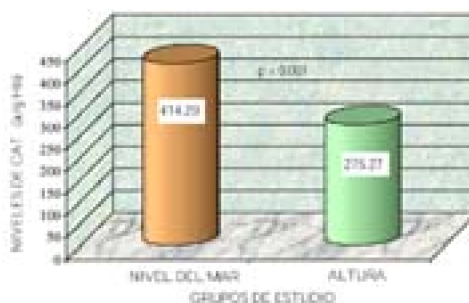


GRÁFICO N° 3: VALOR PROMEDIO DE LOS NIVELES DE CATALASA POR GRUPO DE ESTUDIO

TABLA N° 4: NIVELES DE MALONDIALDEHIDO EN ERITROCITOS DE SUJETOS NATIVOS EN ALTURA Y A NIVEL DEL MAR

N° de Muestra	MDA (nMol / g Hb)	
	Nivel del Mar	Altura
01	9,54	6,58
02	11,27	9,49
03	10,22	8,18
04	10,45	11,98
05	10,42	7,74
06	10,22	7,19
07	10,84	7,74
08	11,53	6,00
09	11,94	7,27
10	11,13	10,35
11	10,37	5,83
12	12,51	7,21
13	11,34	6,81
14	11,49	10,76
15	9,58	6,53
16	11,42	11,56
17	15,80	9,02
18	11,40	6,98
19	8,98	8,66
20	12,24	12,91
21	10,55	7,27
22	12,90	8,06
23	12,86	12,41
24	9,91	7,31
25	12,35	8,40
26	14,25	10,03
27	10,19	9,91
28	10,81	8,82
29	7,95	8,15
30	10,44	8,78
PROMEDIO	11,16	8,60

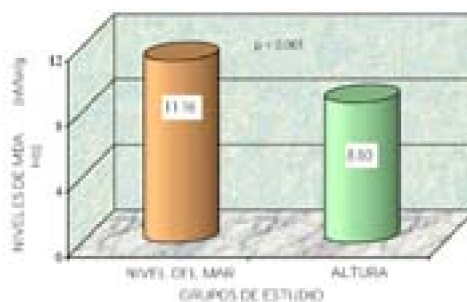


GRÁFICO N° 4: VALOR PROMEDIO DE LOS NIVELES DE MALONDIALDEHIDO POR GRUPO DE ESTUDIO

TABLA N° 5: Parámetros estadísticos de Superóxido Dismutasa (SOD), Glutathion Peroxidasa (GPx), Catalasa (CAT) y Malondialdehído (MDA) SUJETOS NATIVOS EN ALTURA Y A NIVEL DEL MAR

	NIVEL DEL MAR		ALTURA		p
	n = 30		n = 30		
	X	DS	X	DS	
SOD	4104,35	1917,90	4140,56	1147,69	n.s
GPx	37,78	8,87	66,86	8,97	< 0,001
CAT	414,29	81,07	275,27	44,21	< 0,001
MDA	11,16	1,55	8,60	1,91	< 0,001

V. DISCUSIÓN

Llevar a cabo funciones vitales con una menor cantidad de oxígeno representa un gran reto. La hipoxia, como se ha dicho anteriormente, es uno de los principales factores ambientales que está vinculado de manera directa a la salud de millones de personas que viven, trabajan y mueren en las grandes alturas. El organismo ha tenido que desarrollar diversos mecanismos adaptativos, no obstante pueden no ser del todo eficientes en lo concerniente a los procesos peroxidativos.⁽⁴⁵⁾

Un indicador sensible en la valoración del nivel del estrés oxidativo son los eritrocitos, que durante su ciclo vital entran en contacto con las más diversas estructuras orgánicas. Su función como transportador de gases los torna particularmente susceptibles a la oxidación por los radicales libres. De este modo los eritrocitos se presentan como marcadores biológicos de agresiones tóxicas y oxidantes en diferentes órganos y sistemas.⁽⁵¹⁾

En cuanto a los efectos de la hipoxia sobre las enzimas antioxidantes presentes en el organismo, Angelo Agostoni y colaboradores hicieron observaciones preliminares que indicaban un incremento de la actividad de tales enzimas en estados de hipoxia crónica. Nuestros resultados de la enzima Glutation peroxidasa (GPx) muestran un marcado incremento en los valores hallados en los sujetos nativos de altura. Este hecho estaría justificado debido a que el poblador andino posee valores aumentados de hemoglobina y hematocrito como mecanismo de adaptación a la menor presión barométrica a la que está expuesto. En este sentido, cabe destacar que la GPx es más eficiente frente al estrés oxidativo que la Catalasa y mucho más que la Superóxido dismutasa, razón por la

cual la GPx constituye un importante mecanismo de defensa.⁽¹⁾ La GPx posee una mayor afinidad para descomponer el peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión (GSH), lo que sugiere que en condiciones normales es esta enzima la que lo degrada principalmente, teniendo en cuenta el alto contenido de glutatión en glóbulos rojos.⁽⁵³⁾ Esta reacción es importante, ya que la acumulación de H_2O_2 puede reducir la duración de la vida del eritrocito al incrementar la velocidad de oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina. Además la GPx proporciona una importante línea de defensa, junto a la vitamina E, contra la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, puesto que la GPx también actúa neutralizando los peróxidos antes que pueda propagarse la reacción en cadena y lesionar membranas.⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾⁽⁴⁴⁾

La actividad de la Catalasa (CAT) eritrocitaria mostró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio, siendo menor en los sujetos nativos de altura. Esta diferencia observada está de acuerdo con lo manifestado por Perales y Torres en su investigación a cerca de los niveles de catalasa en diversos tejidos de cobayos, en los que evidenciaron que en hipoxia crónica, la actividad de la catalasa se encuentra disminuida.⁽⁵²⁾ Esto se basa en el hecho de que la catalasa tiene una Km alta para el H_2O_2 , por tanto, su efecto es limitado y sólo puede ejercer su función bajo condiciones donde el NADPH sea un factor limitante o cuando los niveles de H_2O_2 estén particularmente elevados.⁽⁵⁴⁾ La enzima catalasa mantendría sus niveles normales o disminuidos mientras los otros sistemas antioxidantes funcionen correctamente.⁽²⁶⁾

En relación a los niveles de la enzima superóxido dismutasa (SOD), ambos valores son similares en la altura y a nivel del mar. Esto indicaría que no se daría necesariamente un incremento o que podría estar condicionado a la acción de otros antioxidantes, comportamiento que coincide con lo reportado en otras investigaciones en cobayos (Perales y Torres, 2002; Pajuelo y Yamada, 2003).

Por otro lado, es bien conocido que en las grandes alturas los valores de hematocrito y hemoglobina son mayores que a nivel del mar.⁽⁵⁶⁾ La hemoglobina aumentada participaría en la formación de radicales libres. La combinación de Fe^{2+} y H_2O_2 (reacción de Fenton) daría como resultado la formación del radical hidroxil (OH) el cual cumple un rol importante en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica. Además, el anión superóxido (O_2^-), que se forma en el eritrocito por la autooxidación de hemoglobina a metahemoglobina, también puede reaccionar con H_2O_2 , en una reacción catalizada por Fe^{3+} (reacción de Haber-Weiss), lo que nos podría sugerir consecuentemente un incremento del daño oxidativo.⁽⁴¹⁾⁽⁵⁷⁾

La bibliografía no reporta valores normales de referencia para malondialdehído (MDA) en eritrocitos, los valores dependen del método de determinación. Distintos procedimientos dan diferentes resultados en los ensayos.⁽⁴⁾⁽⁵⁰⁾ Nosotros encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de MDA encontrados en sujetos residentes de altura respecto a los de nivel del mar, siendo los valores menores en la altura. Este hecho se debería precisamente a la importante acción antioxidante de la glutatión peroxidasa incrementada significativamente en los sujetos de altura y que podría estar actuando de forma sinérgica con la vitamina E, ya que está demostrado que el radical α -tocoferoxil puede ser reducido a α -tocoferol por reacción con el glutatión catalizado por la GPx⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾ y así interrumpir las reacciones en cadena e impidiendo la

formación de una mayor cantidad de MDA. No obstante, esto no implica necesariamente que en algún momento la injuria hipóxica supere los sistemas antioxidantes.

Por lo expuesto, es de fundamental importancia la defensa que ejerce el sistema antioxidante en los pobladores de las grandes alturas y existe la necesidad de intensificar la investigación sobre el tema para incrementar la eficiencia en la prevención y atenuación de los efectos negativos causados por el estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias Superóxido dismutasa, Catalasa y Glutation peroxidasa, y la determinación de Malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en sujetos residentes de altura y de nivel del mar, llegamos a las siguientes conclusiones:

Los niveles eritrocitarios de superóxido dismutasa de los sujetos de altura fueron ligeramente mayores que los de nivel del mar, aunque sin significancia estadística ($p > 0,05$).

Los niveles de glutacion peroxidasa en eritrocitos de sujetos de altura se encuentran notablemente elevados respecto a los sujetos a nivel del mar ($p < 0,001$).

Los sujetos de altura presentan una actividad de catalasa disminuida en relación a los sujetos a nivel del mar ($p < 0,001$).

Los niveles de malondialdehído son menores en los sujetos nativos de altura ($p < 0,001$).

RECOMENDACIONES

1. Medir la actividad de las enzimas antioxidantes en diferentes patologías.
2. Determinar los indicadores del daño oxidativo y relacionarlos con los niveles de antioxidantes no enzimáticos tales como las vitaminas E y C.

BIBLIOGRAFÍA

- Cisneros E. La Glutacion reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1995; 14 (1)
- Pérez P, Pérez J. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 1999; 29 (3): 192 – 198.
- Monge C, León F. El reto fisiológico de vivir en los Andes. 1ra ed. Lima: Fondo Editorial UPCH; 2003.
- Vicente M, Miñano M. Determinación de algunos antioxidantes en sujetos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.
- Delatre J, Bonnefont-Rousselot D. Oxidative Stress, Free Radicals and aging. *Biotech Lab. Int*. 1998; 3 (2): 21 – 23.
- Winyard P, Hidder R, Brailsford S, Drake A, Lunec J, Blake D. Effects of Oxidative Stress on some physicochemical properties of ceruloplasmin. *Journal of Biochemistry*. 1989; 258: 438 – 445.
- Rodriguez J, Menendez J, Trujillo Y. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 2001; 30 (1): 15 – 20.
- Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicos. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 1994; 1: 16-19.
- Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM. The NADPH oxidase of leukocytes: the

- respiratory burst oxidase. En: Scandalios JG. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press;1997. pp 737 – 783.
- Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino Y, Pai EF. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure – based mechanism of conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. 2000; 97: 10723 – 10728.
- Céspedes E, Hernández I, Llópiz N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los Radicales Libres: II. Catalasa. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 1997; 15 (2)
- Montero M. Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Anales de la Facultad de Medicina. 1996; 57 (4): 278 – 281.
- Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, Transition metals and disease. J. Biol. Chem. 1988; 263: 9692 – 96.
- Zentella P, Corona G. Toxicidad del Oxígeno: Papel de los Radicales Libres en la Peroxidación de los Lípidos. BEB. 1994; 13 (3): 87 – 97
- Martínez M. Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. Ars. Pharmaceutica. 1998; 39 (1): 5 – 18.
- Murray R. Eritrocitos y Leucocitos. En: Granner D, Mayes P, Murria R, Rodwell V. Bioquímica de Harper. México D.F.: El Manual Moderno; 1999. p: 823 - 841.
- Nagababu E, Rifkind J. Reaction of Hydrogen Peroxide with Ferryl Hemoglobin: Superoxide production and Heme degradation. Biochemistry. 2000; 39 (40): 12503 - 12511.
- Gil del Valle L, Reyes A, Sánchez G, Fernández O. Terapia Antioxidante en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Acta Farmacéutica Bonaerense. 2002; 21 (4): 301 - 308.
- Boberis A, Costa L, Junqueira V. Envejecimiento Mitocondrial. Revista Ciencia e Investigación. 2000; 3 (1)
- Prior W, Burdon R. Aldehydes, Hydrogen Peroxide, and Organic radical as mediators of oxygen toxicity. Free Rad. Biol. Chem. 1991; 11: 41 – 46.
- Mayes P. Oxidación Biológica. En: Granner D, Mayes P, Murria R, Rodwell V. Bioquímica de Harper. México D.F.: El Manual Moderno; 1999. pp: 135 - 142.
- Halliwell B, Gutteridge J. The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. Trends Biochemical Science. 1990; 15: 129 – 135.
- Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th Edition; Oxford: 1999.
- Tank L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The Mechanism of Fe^{+2} initiated Lipid Peroxidation in Liposomes: The dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. Journal of Biochemical. 2000; 352 (1): 27 – 36.
- Södergren E. Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. 2000; 949 (78)

- Tiskow G. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 1996; Año 2 (1): 44 – 57.
- Halliwell B, Gutteridge J. Lipid Peroxidation: A radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press; 1989. pp. 188 – 266.
- Block G. A role of antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Res.* 1992; SO: 207 – 213.
- Jacob RA. The Integrated Antioxidant System. *Nutr. Res.* 1995; 15: 755 – 766.
- García B, García O, Clapes S, Rodes L, García J. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los Radicales Libres: I. Superóxido Dismutasas. *Rev. Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1997; 15 (1)
- Casado A, De la Torre R, López E, Carrascosa D, Venarucci D. Niveles de Superóxido dismutasa y Catalasa en enfermedades del anciano. *Gaceta Médica Mexicana*. 1998; 134 (5): 539 – 544.
- Janssen A, Bosman C, Sier C, Griffioen G, Kubben F, Lamers C, et al. SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients". *British Journal of Cancer*. 1998; 78 (8): 1051 – 1057.
- Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide dismutasa. *Ann. Rev. Biochem.* 1995; 64: 97 – 112.
- Matsumoto O, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu-Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 38388 – 38393.
- Tosaki A, Droy-Lefaix M, Pali L, Das DK. Effects of SOD, Catalase and a novel antiarrhythmic drug; EGB 761, on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Free Radic Biol. Med.* 1993; 14: 361 – 370.
- Cisneros E, Pupo J, Céspedes E. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los Radicales Libres: III. Glutathion Peroxidasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1997; 16 (1): 10 – 15.
- Mayes P. Vía de la Pentosa Fosfato y otras vías del metabolismo de hexosas. En: Granner D, Mayes P, Murria R, Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. México D.F.: El Manual Moderno; 1999. pp: 235 - 246.
- Avissar N, Slemmon J, Palmer I. Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. *Journal of Nutrition*. 1992; 12 (6): 1243 – 1249.
- Stepanik T, Ewing D. Isolation of Glutathione peroxidasa, Catalase and Superoxide dismutasa of human erythrocytes. *Journal of Biochemistry and Biophysics*. 1993; 20: 157 – 169.
- Maiorino M, Chu F, Ursoni F. GPx-PH is the 18 KDa Selenio proteins expressed in human tumor cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266 (12): 7728 – 32.
- Berrocal N, Valdez A. Niveles Plasmáticos de MDA como indicador de la Peroxidación Lipídica en cobayos de altura. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 1997.
- Mayes P. Estructura y Función de las Vitaminas Liposolubles. En: Granner D, Mayes P, Murria R, Rodwell V. *Bioquímica de Harper*. México D.F.: El Manual Moderno; 1999. pp: 701 - 713.

- Bruce S, Mc Ewen. Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *The New Journal of Medicine*. 1998; 338 (3): 171 – 178.
- Ríos M. El Estrés Oxidativo y el Destino Celular. *Revista Química Viva*. 2003; 2 (1)
- González GF, Villena A. Aclimatación y Adaptación a las grandes alturas. *Acta Andina*. 1998; 7: 17 – 23.
- Guyton A. *Tratado de Fisiología Médica*. 10ma ed. Madrid: McGraw-Hill; 2001.
- Cosío G, Yatacco A. Valores de Hemoglobina en relación con la altura sobre el nivel del mar. *Salud Ocupacional* 1996. 13: 5 – 17.
- González G, Gómez C, Villena A. Contribución Peruana a la Hematología en poblaciones de la altura. *Acta Andina*. 1993; 2: 213 – 225.
- Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121 – 126.
- Hong Y, Yeh S, Chang C, Hu M. Total Plasma Malondialdehyde Levels in 16 Taiwanese College Students Determined by Various Thiobarbituric Acid Test and an Improved High – Performance Liquid Chromatography – based Method. *Clinical Biochemistry*. 2000; 33 (8): 619 – 625.
- Aguilar R, Moraes T, Moraes G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitario de pessoas com Síndrome de Down. *Revista Brasileira de Hematología e Hemoterapia*. 2003; 25 (4).
- Perales M, Torres C. Niveles de MDA y Catalasa en tejidos de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.
- Vergaray L, Robles Y, Flores E, Suárez S. Correlación entre los niveles de Hemoglobina glicada y las enzimas Antioxidantes, en pacientes con Diabetes Mellitus tipo II. *Ciencia e Investigación*. 2000; 3 (1): 49 – 58.
- Mamposo M, León O, Cicea M, Pérez B, Castillo R. Especies Reactivas de Oxígeno en la Diabetes Mellitus y sin ella. *Rev. Cub. Endo*. 1999; 10 (1): 8 – 15.
- Pajuelo M, Yamada L. Enzimas Antioxidantes en cerebro de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2003.
- Rojas A, Virhuez P, González E. Niveles de Ácido Úrico, Hemoglobina y Hematocrito en nativos de las grandes alturas. *Ciencia e Investigación*. 2000; 3 (2): 26 – 33.
- Romero F, Bosch F, Romero M, Jareño E, Romero B, Marin N, et al. Lipid Peroxidation products and Antioxidants in human diseases. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106 (5): 1229 – 1232.
- Pita G. Funciones de la Vitamina E en la nutrición humana. *Rev. Cub, Aliment. Nutr*. 1997; 11 (1): 46 – 57.
- Shindo Y, Witt E, Han D, Eptein W, Parker L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 1994; 102: 122 – 24.