

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Indicadores de estrés oxidativo en eritrocitos de una  
población de Huaraz**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Juana Dora Coz Ramón

Jhonatan Nikolai Villavicencio Villanueva

ASESORES

Elizabeth Carranza Alva

Haydeé Zúñiga Cáceres

**Lima – Perú**

**2013**

## **Agradecemos por siempre**

A nuestras madres Mary e Ida Ruth,  
Quienes siempre nos apoyan incondicionalmente  
en nuestras vidas.

A nuestros padres Juan, Edgard y Nicolás  
Por cuidarnos y guiar nuestro camino.

A nuestras hermanas Yasmin y Lynn,  
Gracias por su amistad y fidelidad.

Y muy afectuosamente a nuestra asesora  
Q.F. Elizabeth Carranza, por su buena Fe,  
Solidaridad y confianza en nosotros.

**Dedicamos nuestro trabajo a:**

Nuestro hijo  
Nicolás Valentino

Las Dras. Haydeé Zúñiga,  
Gloria Gordillo, Karim Jiménez  
y los Drs. Eduardo Flores,  
Gustavo Guerra.

A nuestra familia que siempre  
estará con nosotros.

## ABREVIATURAS

SOD	---	Superóxido dismutasa.
CAT	---	Catalasa.
ERO	---	Especies reactivas del oxígeno.
GPx	---	Glutación peroxidasa.
GSH	---	Glutación reducido.
GSSG	---	Glutación oxidado.
MDA	---	Malondialdehído.
PUFA	---	Ácido graso poliinsaturado.
GRd	---	Glutación Reductasa.
RO <sup>•</sup>	---	Radical alcoxil.
ROO <sup>•</sup>	---	Radical peroxil.
ROOH	---	Hidroperóxido.
LOOH	---	Hidroperóxido lipídico.
OONO <sup>•</sup>	---	Anión peroxinitrito.
OCl	---	Ión hipoclorito.
NO <sup>•</sup>	---	Óxido nítrico.

## RESUMEN

El estrés oxidativo ocasionado por la exposición de sujetos nativos a mediana altura por acción de los radicales libres de oxígeno, fue evaluado por la actividad de enzimas antioxidantes eritrocitarias.

Se determinaron las actividades de las enzimas antioxidantes: Glutación 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 mediana altura (Huaraz, 3050 msnm) y 30 residentes de nivel del mar (Lima, 154 msnm).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de Superóxido dismutasa (SOD) de los nativos de mediana altura ( $938.4 \pm 239.5$  U /g Hb) y los de nivel del mar ( $769.3 \pm 279.9$  U /g Hb), ( $p < 0.05$ ); así como la actividad de la Catalasa (CAT) a mediana altura ( $110.7 \pm 42.5$  kU /g Hb) y los del nivel de mar ( $83.7 \pm 40.4$  kU /g Hb), ( $p < 0.05$ ). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la actividad de la Glutación peroxidasa (GPx) a mediana altura y nivel del mar ( $65.1 \pm 25.7$  U /g Hb vs.  $56.4 \pm 14.6$  U /g Hb), respectivamente. La concentración de Malondialdehído en los nativos de mediana altura no mostraron diferencia estadística significativa ( $35.1 \pm 21.7$   $\mu$ moles /g Hb) con los de nivel del mar ( $27.1 \pm 6.3$   $\mu$ moles /g Hb), ( $p > 0.05$ ).

La exposición a la mediana altura influye en la actividad de enzimas antioxidantes eritrocitarias, especialmente en la SOD y CAT que juegan un rol importante en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, lo que explicaría el incremento de su actividad a mediana altura.

**Palabras clave:** Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, malondialdehído, peroxidación lipídica, hipoxia y estrés oxidativo en la altura.

## SUMMARY

The effect of oxidative stress by exposure to medium altitude native subjects by the action of oxygen free radicals was assessed by the activity of erythrocyte antioxidant enzymes.

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 medium altitude (Huaraz, 3050 m above sea level) and 30 residents at sea level (Lima, 154 m above sea level).

It was found significant difference statistic between the activity of Superoxide dismutase higher in the native of medium altitude ( $938.4 \pm 239.5$  U/g Hb) and people living at sea level ( $769.3 \pm 279.9$  U/g Hb), ( $p < 0.05$ ). The activity of catalase at medium altitude ( $110.7 \pm 42.5$  kU/g Hb) and people living at sea level ( $83.7 \pm 40.4$  kU/g Hb), ( $p < 0.05$ ). It was not found significant difference statistic between the activity obtained of Glutathione Peroxidase at medium altitude and sea level ( $65.1 \pm 25.7$  U/g Hb vs.  $56.4 \pm 14.6$  U/g Hb), respectively. The levels of Malondialdehyde in the native of medium altitude not significant difference ( $35.1 \pm 21.7$   $\mu$ moles/g Hb) that sea level obtained ( $27.1 \pm 6.3$   $\mu$ moles/g Hb), ( $p > 0.05$ ).

Exposure to medium altitude influences the activity of erythrocyte antioxidant enzymes, especially SOD and CAT play an important role in the detoxification of reactive oxygen species, which may explain the increased activity at a medium altitude.

**Keys word:** Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, malondialdehyde, lipid peroxidation, hypoxia and oxidative stress at high altitude.



# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	4
2.1 CONCEPTOS TEÓRICOS	4
2.1.1 Radicales libres	4
2.1.2 Producción de radicales libres: Iniciación, propagación y terminación	4
2.1.3 Especies reactivas de oxígeno (ERO)	6
2.2 MECANISMO DEL DAÑO	15
2.3 MECANISMOS DE DEFENSA CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO	20
III. PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 Material biológico	32
3.2 Aparatos y materiales	33
3.2.1. Equipos de laboratorio	33
3.2.2. Material de laboratorio	33
3.3 Métodos	33
3.3.1. Determinación de Superóxido dismutasa	33
3.3.2. Determinación de Glutación peroxidasa	36
3.3.3. Determinación de Catalasa	38
3.3.4. Determinación de Malondialdehído	39
3.3.5. Determinación de Hemoglobina	41

IV. RESULTADOS	43
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

## I INTRODUCCIÓN

Los eritrocitos humanos son los más abundantes y una de las células más especializadas en el organismo humano. Aproximadamente 25 trillones de células rojas circularán en la sangre a través del curso de la vida humana. La función principal de los eritrocitos es el transporte de oxígeno ( $O_2$ ) y como mediador en la producción de dióxido de carbono ( $CO_2$ )<sup>1</sup>.

Los organismos multicelulares explotan las propiedades de los metales de transición, como el hierro, para el transporte de oxígeno; el cual, no es muy soluble en el agua y no puede transportarse a los tejidos en cantidad suficiente por simple disolución en el suero sanguíneo<sup>1</sup>. El hierro libre provoca la formación de especies oxigenadas muy reactivas como: anión superóxido, peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo, las cuales pueden dañar el ácido desoxirribonucleico (DNA) u otras macromoléculas. Por lo tanto, el hierro utilizado en las células está presente en formas que lo secuestran y/o lo hacen menos reactivo<sup>1</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son subproductos naturales de la vida aerobia en las células eritrocitarias. Son necesarias para las vías de transducción de señales que controlan el estado redox y el crecimiento celular. En circunstancias normales, las ERO se generan en pequeñas cantidades durante el transporte

mitocondrial de electrones, la fagocitosis y el metabolismo de fármacos, pero son efectivamente neutralizadas por los diferentes niveles del sistema de defensa antioxidante. Emergen como el primer nivel las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GRd) <sup>2,3</sup>. En el segundo nivel encontramos moléculas con actividad antioxidante, entre ellas tenemos: tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), albúmina, ceruloplasmina, ácido úrico, etc.<sup>4</sup>.

En los países andinos un gran porcentaje de la población vive y trabaja en altitudes superiores a 3000 msnm. En el Perú más del 30 % de la población vive sobre los 2000 msnm y casi la totalidad de las empresas mineras, de transporte, la agricultura y muchas otras industrias comprometen el esfuerzo de muchos trabajadores quienes expuestos a grandes altitudes son exigidos física y mentalmente, todas estas actividades demandan que el trabajador consuma una mayor cantidad de oxígeno<sup>2,4</sup>. La menor presión del O<sub>2</sub> en las alturas origina un incremento de las células eritrocitarias. La altitud es un entorno multiestrés, constituido además de la hipoxia, por otros factores como: las radiaciones ionizantes, frío, esfuerzo físico y estrés mental. Cada uno de estos factores de estrés, es capaz de generar radicales libres independientemente.

Estudios previos han demostrado que el nativo de las grandes alturas presenta características diferentes al habitante de zonas ubicadas a nivel del mar. Así mismo, se ha descrito un incremento de la producción de indicadores de estrés oxidativo en músculo, cerebro, sangre, orina y en diferentes tejidos en respuesta a la hipoxia <sup>3,4</sup>. Sin embargo, los problemas de salud en la altura no han sido aún totalmente esclarecidos.

Por lo expuesto, hemos considerado de interés evaluar los indicadores de estrés oxidativo en sujetos nativos de medianas alturas (Huaraz, 3050 msnm) y comparar los resultados con los de sujetos residentes a nivel del mar (Lima, 154 msnm).

Simultáneamente, se evaluará la concentración de malondialdehído, como un indicador de la peroxidación lipídica en ambos grupos de estudio.

Con el presente estudio aportamos información relevante que enriquezca el conocimiento, del efecto de la hipoxia crónica sobre el metabolismo oxidativo en relación con los mecanismos de protección del eritrocito y sobre la acción de las enzimas protectoras que permite conservar la integridad celular en los habitantes de medianas alturas; teniendo en cuenta que más del 30 % de la población peruana habita por encima de los 2 000 msnm.

## **II. GENERALIDADES**

### **2.1 CONCEPCIÓN TEÓRICA**

#### **2.1.1 Radicales Libres**

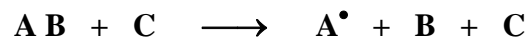
Se define como radicales libres a las moléculas, fragmentos moleculares o átomos que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados en el orbital más externo. La configuración presentada determina su inestabilidad, tiempo de vida muy corta, gran reactividad y con una enorme capacidad para reaccionar con otras sustancias captando y cediendo electrones para estabilizar su carga eléctrica y llegar al equilibrio electrónico. Los radicales libres pueden estar cargados positivamente, negativamente o ser eléctricamente neutros<sup>5</sup>

Es posible sintetizar los radicales libres en condiciones artificiales. Naturalmente se pueden formar en la atmósfera por la radiación ultravioleta y también en los organismos vivos por el contacto con el oxígeno. Los radicales libres actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN<sup>5</sup>.

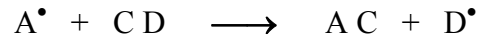
#### **2.1.2 Producción de radicales libres**

Las reacciones que generan radicales libres son procesos en cadena, en los cuales se pueden distinguir tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

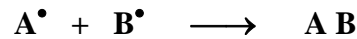
En las reacciones de iniciación, un radical se forma a partir de una especie química estable no radical, según la reacción:



En la propagación, un radical libre reacciona con una molécula estable, según la reacción:



En la terminación dos radicales libres comparten sus electrones desapareados y originan un producto relativamente estable, véase:



Los radicales libres se producen en procesos endógenos normales mediados a través de procesos exógenos. Entre los primeros tenemos a la mitocondria que es la fuente principal de radicales libres. Este proceso productivo se da en la cadena transportadora de electrones, a través de la generación de un gradiente eléctrico que forma adenosin trifosfato (ATP). La fosforilación oxidativa se da entre los sustratos principales y la formación de ATP, generándose diversas moléculas con diferente grado de oxidación, las cuales, después de donar electrones al oxígeno, producen intermediarios denominados previamente como radicales libres<sup>6</sup>.

Otras fuentes son los peroxisomas, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno. También los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante estimulada por diversas proteínas que actúan sobre ellos (complemento, interleukinas, etc.). La enzima nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), presente en la membrana leucocitaria es generadora de radicales libres en procesos inflamatorios<sup>6</sup>.

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 calcio  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) genera el anión superóxido<sup>7</sup>.

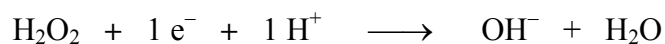
Como fuentes exógenas de radicales libres tenemos a xenobióticos, humo del cigarro, drogas como la adriamicina, radiaciones ultravioleta, ciertos componentes de la dieta (sales de hierro, cobre y compuestos fenólicos), traumatismos, procesos inflamatorios, ejercicios extenuantes, estados de hiperoxia, etc.<sup>7</sup>.

### 2.1.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

De todos los radicales libres, estudiaremos a las especies reactivas derivadas del oxígeno, debido a su estructura molecular birradicálica y al gran número de procesos en los que las ERO pueden verse involucradas.

Una proporción alta del oxígeno celular es reducido a agua, pero del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente y ocurre la reducción monovalente, la cual produce la formación de ERO parcialmente reducidas, también conocidos como oxi-radicales o intermediarios de la reducción del oxígeno. La denominación ERO agrupa también a algunos compuestos que, como el peróxido de hidrógeno, no constituyen verdaderos radicales<sup>7</sup>.

Las especies reactivas de oxígeno se originan a través de una serie de transferencias monoelectrónicas:





Como podemos ver, la reducción monoelectrónica 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 ( $\text{ROO}^\bullet$ ) y el alcoxil ( $\text{RO}^\bullet$ ). También existe el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), el anión peroxinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ ) y el ión hipoclorito ( $\text{OCl}$ ) formado a partir del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la enzima mieloperoxidasa<sup>7</sup>.

## 2.1.4 Tipos de especies reactivas oxigenadas

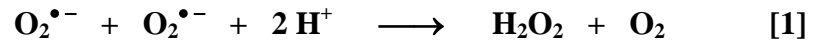
**2.1.4.1 Oxígeno Singlete ( $^1\text{O}_2$ )** Llamado también Oxígeno Singlete. Es una forma excitada de la molécula de oxígeno diatómico y constituye un potente agente oxidante capaz de combinarse con múltiples moléculas con las que no reacciona el oxígeno en su estado basal<sup>7</sup>.

Se genera en o sobre la piel por transferencia de energía desde otra molécula reactiva, por reacciones fotoquímicas o por reacciones de fotosensibilización<sup>7</sup>.

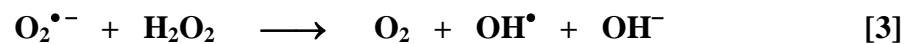
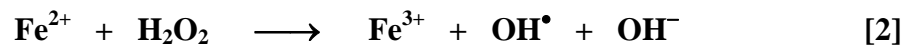
La inversión de los electrones de los orbitales del oxígeno molecular origina dos formas de oxígeno singlete: el oxígeno singlete delta ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ ) que, debido a su larga vida media, es el de mayor importancia biológica y el *oxígeno* singlete sigma ( $^1\Sigma_g^+$ ) más reactivo que el anterior pero de corta vida media, porque rápidamente decae al estado delta antes de que tenga tiempo de reaccionar<sup>7</sup>.

**2.1.4.2 Anión Superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ )** Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido. Esta es una especie química que en comparación con otras ERO, no es altamente reactiva y no puede reaccionar directamente con las biomoléculas, además es inestable en soluciones acuosas porque

reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación, la cual se acelera por acción de la enzima superóxido dismutasa. (Reacción N° 1)<sup>7,8</sup>.



La reacción del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 N° 2). En 1934, Haber y Weiss descubrieron que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden reaccionar en presencia de iones férricos como catalizador y producir radicales hidroxilo (Reacción N° 3).



El superóxido se forma en el eritrocito por la autooxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (se calcula que alrededor del 3 % de hemoglobina se autooxida al día en los eritrocitos humanos), en otros tejidos se forma por la acción de enzimas como la citocromo P450 reductasa y xantina oxidasa<sup>8</sup>.

**2.1.4.3 Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** 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 llevado 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 N° 1)<sup>8</sup>.

El peróxido de hidrógeno 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 en distintas condiciones patológicas durante la injuria celular. La concentración normal de peróxido de hidrógeno en plasma humano es de 4 a 5  $\mu\text{M}$  y se incrementa bajo condiciones inflamatorias<sup>8</sup>.

**2.1.4.4 Radical Hidroxilo (OH $\cdot$ )** De todas las especies reactivas del oxígeno 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 la formación de radicales libres en 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  $\text{Fe}^{2+}$  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<sup>8,9</sup>.

### **2.1.5 Peroxidación Lipídica**

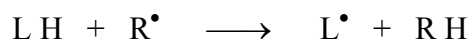
Los lípidos son un grupo heterogéneo de componentes que tienen varias funciones importantes en el cuerpo tales como: fuente eficiente de energía, constituyente de membranas celulares, tejido nervioso, aislante térmico y eléctrico; así como hormonas locales<sup>10</sup>.

El mecanismo de peroxidación lipídica inducida por radicales libres fue establecido en la década del 40 por Farmer y col. trabajando en los laboratorios de investigación de la British Rubber Producers Association. En los años 50, la relevancia de la

peroxidación lipídica en sistemas biológicos y medicina empezó a ser explorada<sup>10</sup>. La peroxidación lipídica en membranas biológicas ha sido considerada como uno de los mayores mecanismos de injuria celular en organismos aerobios sujetos a estrés oxidativo<sup>10</sup>.

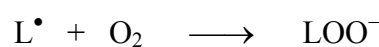
Se denomina peroxidación lipídica o lipoperoxidación al proceso de oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos poliinsaturados (en inglés PUFAS - polyunsaturated fatty acids) son particularmente afines a la peroxidación porque poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que le confiere una zona de enlace diana, el cual permite que una molécula activa como el  $\text{OH}^\cdot$  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<sup>11</sup>. Por lo tanto, el proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

**La iniciación** es cuando la unión C-H de los PUFA 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 ( $\text{L}^\cdot$ ) al dejar un electrón desapareado en el carbono. El inicio se expresa en la siguiente reacción:



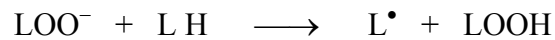
Donde:  $\text{L H} = \text{PUFA}$  y  $\text{R}^\cdot = \text{Radical libre derivado de oxígeno}$ .

El radical carbonilo resultante ( $\text{L}^\cdot$ ) sufre un reordenamiento molecular originando un dieno conjugado, y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peroxilo ( $\text{LOO}^\cdot$ )



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<sup>•</sup>), entrando la peroxidación en una fase de **propagación:**

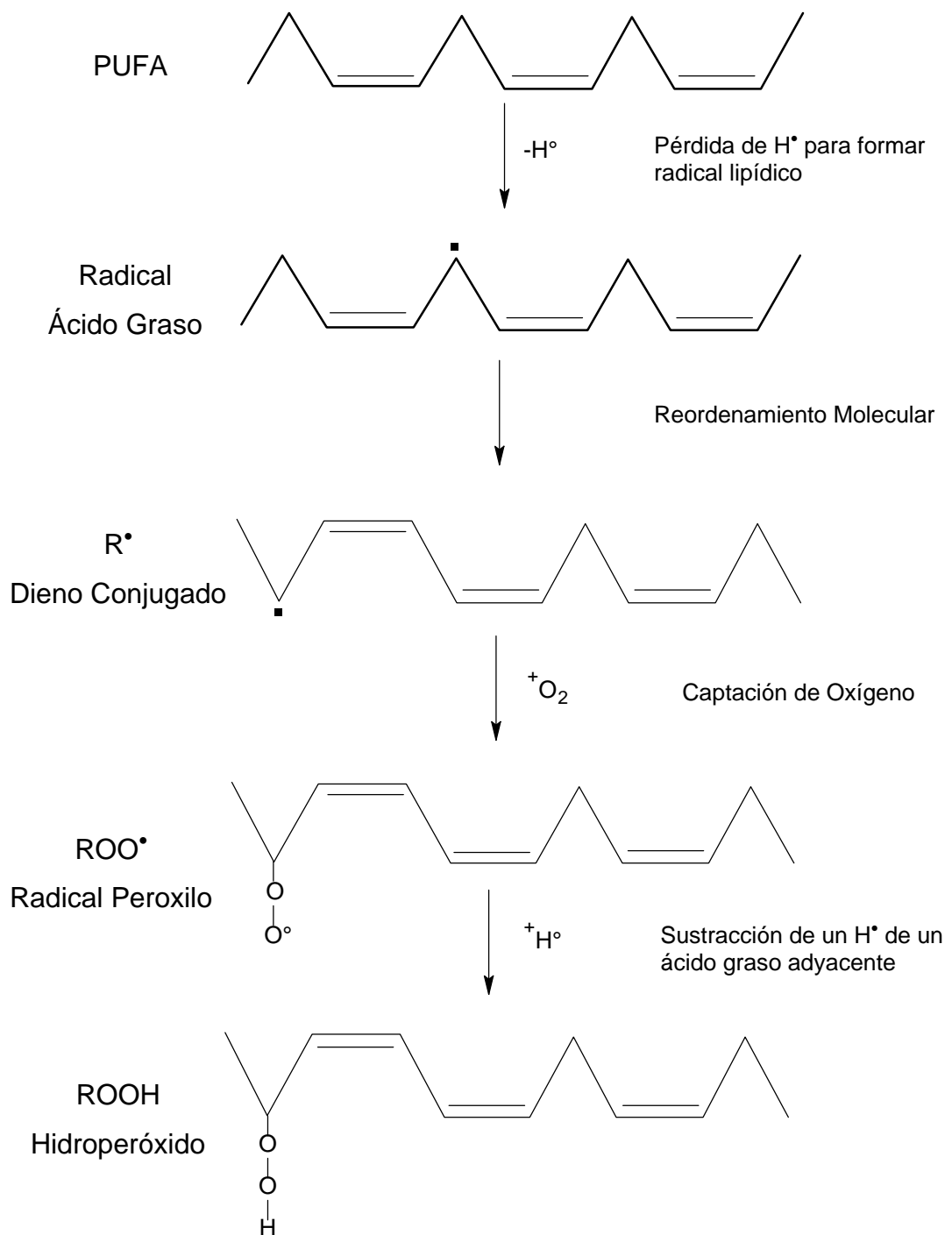


El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de oxígeno, composición de ácidos grasos, relación de lípido-proteína y presencia de antioxidantes.

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 <sup>10,11</sup>. 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, que es un indicador de la lipoperoxidación. Cabe señalar que, en las reacciones de terminación se da la formación del oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) como producto secundario de la lipoperoxidación <sup>11</sup>.

La mayoría de métodos de laboratorio para determinar el daño producido por los radicales libres o cuantificar el estrés oxidativo, se basan en la medición de los productos oxidados de los PUFA. Estos métodos incluyen el dosaje de malondialdehído (MDA), estudio de dienos conjugados, la medición de energía lumínica (fotoemisión que producen las moléculas terminales de la peroxidación lipídica) <sup>11</sup>.



Fuente: Adriazola M, Olivera P. <sup>4</sup>

**FIGURA 1: MECANISMO DE LA PEROXIDACION LIPÍDICA**

### 2.1.6 Carga redox y el estrés oxidativo en eritrocitos

El hierro es el elemento de transición más abundante, importante y esencial en las reacciones bioquímicas. Un grupo heterogéneo de proteínas contienen hierro en una variedad de formas moleculares <sup>1,12</sup>.

El hierro no sólo se une reversiblemente al oxígeno, también participa en un gran número de reacciones de oxidación-reducción. Para enlazar oxígeno, el hierro heme se debe mantener en el estado reducido. Si estos mecanismos fallan, la hemoglobina (Hb) se vuelve no funcional <sup>12</sup>.

A consecuencia de este proceso, el hierro se libera de Hb (o sus derivados) y la liberación va acompañada por la formación de metHb. Los niveles de hierro en la célula deben ser delicadamente equilibrados porque la carga de hierro conduce al daño por radicales libres. Los cationes de cobre y el hierro presentes en algún material tóxico pueden promover la formación de ERO por la reacción de Fenton que se produce cuando el exceso de hierro reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para generar OH• <sup>13,14</sup>. Para lograr niveles apropiados de hierro celular y evitar las cargas de hierro, las proteínas de transporte, almacenamiento y regulación han evolucionado <sup>14</sup>. El hierro liberado de sus macromoléculas de almacenamiento representa la fuente de hierro catalizada por el estrés oxidativo, tales como lípidos, proteínas y oxidación ADN. También se cree que estos procesos ocurren no sólo en patologías, sino también en condiciones fisiológicas tales como las que regulan las vías de transducción de señales <sup>14</sup>. Debido a la abundancia de O<sub>2</sub> en medios acuosos, la autooxidación del ión ferroso puede ser una vía importante para la formación de radicales libres. Esta reacción se traduciría en la formación de Fe-O complejos, denominados como iones ferrilo o perferryl. Debido a su

alta afinidad electrónica, estos iones tienen reactividades cercanas a tales efectos del  $\text{OH}^-$ <sup>13,14</sup>.

Las especies ferrilo son fuertes oxidantes para varias biomoléculas incluyendo la vitamina E, la vitamina C, colesterol, catecolaminas, lipoproteínas, y la membrana lipídica<sup>14</sup>. La liberación de hierro en una forma reactiva puede ser relevante para la generación del antígeno de senescencia (SCA). Signorini et al.<sup>15</sup> demostraron la relación entre la liberación de hierro, la oxidación de las proteínas de membrana y la unión de la inmunohemoglobina G (IgG) autóloga, es decir, formación de SCA en un modelo *in vitro* de envejecimiento rápido de eritrocitos.

Se ha informado que la incubación aeróbica de los eritrocitos en tampón acelera marcadamente el envejecimiento de eritrocitos, medida por vesiculación. La liberación de hierro estuvo acompañada también por oxidación o alteración de las proteínas de membrana. La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) demostró la aparición de nuevas bandas en el rango de 45-66 kDa. Estas bandas no fueron observadas después de incubación anaerobia, se considera un índice de envejecimiento de eritrocitos y se cree que proceden de la degradación oxidativa de la proteína banda 3. Además, resultados similares se han obtenido utilizando un agente quelante del hierro como agente de protección<sup>16</sup>.

El uso de células rojas como portadores de sustancias bioactivas ha sido explorado como un nuevo campo de investigación. Desde una perspectiva terapéutica, los eritrocitos pueden actuar como un depósito de fármaco, proporcionando liberación sostenida en el cuerpo. Los encapsulados *in vitro* de complejos de  $\text{Cu}^{+2}$  en eritrocitos demostraron ser causas de estrés oxidativo leve, en comparación con las células sin carga y nativas; los eritrocitos portadores para la administración de quelantes de hierro



deferoxamina y de otros pueden ser útiles para mejorar la eficiencia de quelación de hierro <sup>16</sup>.

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis de oxidorreducción intracelular, es decir el desbalance entre la producción y la remoción de ERO (prooxidantes y antioxidantes), que conlleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el daño celular <sup>15,17</sup>.

El estrés oxidativo puede originarse por una deficiencia del sistema de defensa antioxidante o por un incremento de la producción 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 ocasionados por la enfermedad <sup>16,17</sup>.

## **2.2 MECANISMO DEL DAÑO**

### **2.2.1 Envejecimiento oxidativo en eritrocitos maduros**

Los eritrocitos maduros tienen una vida útil finita. Aunque los mecanismos moleculares que determinan la eliminación de las células de la circulación siguen siendo desconocidas, las células rojas proporcionan un esquema para el estudio del envejecimiento celular. Los estudios sobre el volumen de células rojas en personas jóvenes han dado lugar a varias hipótesis acerca de los mecanismos involucrados en la generación de señales de la senescencia y la eliminación de los eritrocitos envejecidos por los macrófagos esplénicos <sup>18</sup>. El proceso de envejecimiento eritrocitario es un evento multifactorial y en la comprensión de la interrelación entre los diversos cambios

celulares es esencial definir el complejo proceso de senescencia celular. La teoría sostiene que los radicales libres son una sustancia química ampliamente aceptada.

Los orígenes de esta teoría del envejecimiento surge a mediados del siglo XX, desde que se descubrieron los radicales libres oxigenados, tradicionalmente fueron considerados demasiado reactivos para existir biológicamente<sup>7,18</sup>. En teoría, el envejecimiento por radicales libres es el resultado del daño oxidativo, que es acumulativo y afecta a biomoléculas tales como: proteínas, lípidos y los ácidos nucleicos<sup>7,18</sup>.

Otros mecanismos propuestos incluyen la senescencia antigénica por los fagocitos, la fatiga, el agotamiento del ATP mecánico y acumulación de calcio. Las membranas de eritrocitos humanos expuestos a estrés oxidativo en la circulación son sometidas a varias modificaciones de sus componentes celulares. Estos incluyen la formación de Hb oxidativamente desnaturalizada, lípidos peroxidados, proteínas de membrana reticulada de alto peso molecular, sialilación de glicoproteínas. Estos procesos conducen a la simétrica disminución de fosfolípidos, la formación de retículo espectral y Hb, la agregación de la proteína banda 3 y el aumento de productos avanzados de glicación<sup>19</sup>.

### **2.2.2 Daños producidos por las especies reactivas de oxígeno:**

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<sup>20</sup>. En 1954, Gerschman R sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades<sup>7,20</sup>.

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)<sup>18,20</sup>.

Proteínas, lípidos insaturados, ácidos nucleicos y carbohidratos son los blancos fundamentales de las acciones de los radicales libres:

- **PROTEÍNAS:** son modificadas de diferente manera por las ERO. 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 aminoacídicas 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<sup>18,20</sup>.

- **LÍPIDOS:** de acuerdo a las características de la oxidación lipídica por los radicales libres, se trata de una reacción en cadena en la que al oxidarse el ácido graso se convierte en un radical de ácido graso, con capacidad de oxidar a otra molécula vecina<sup>21</sup>. 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. 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<sup>21</sup>.

- **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  $\text{OH}^\cdot$ . 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<sup>21</sup>.

- **LOS CARBOHIDRATOS:** son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares como: glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) 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<sup>21</sup>.

### **2.2.3 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 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<sup>8,22</sup>.

#### **2.2.4. El papel de las especies reactivas de oxígeno en necrosis-apoptótica muerte eritrocitaria**

La muerte celular puede ocurrir a través de la apoptosis o necrosis. La muerte celular inducida por el estrés oxidativo excesivo se ha supuesto que se produzca por necrosis.

Los niveles de GSH disminuyen durante la apoptosis, lo que puede indicar que, un aumento en el estrés oxidativo induce la muerte celular. También se ha demostrado que los antioxidantes enzimáticos como SOD y CAT pueden inhibir la apoptosis. Sin embargo, Shimizu et al.<sup>23</sup>, han sugerido que el aumento intracelular de ERO en los sistemas de apoptosis puede ser causado por la hipoxia, en lugar de estar involucrado en su inducción. Así, el incremento detectado en ERO podría ser una respuesta secundaria<sup>23</sup>. Los mecanismos que subyacen a la apoptosis de eritrocitos son aparentemente importantes para el ajuste de la duración de la vida de los eritrocitos.

Mecanismos similares pueden ser operativos en las células nucleadas, donde puede estar oculto por la maquinaria apoptótica más compleja. Este mecanismo se puede denominar muerte suicida de eritrocitos (eryptosis), estrés celular, choque osmótico, estrés oxidativo o agotamiento de la energía, al activar  $Ca^{+2}$  sensibles a los canales de  $K^{+}$  en la membrana celular de eritrocitos; presumiblemente a través de la generación de prostaglandinas que estimulan eryptosis<sup>23</sup>. Aunque un alto grado de estrés oxidativo puede causar necrosis, niveles inferiores desencadenan la apoptosis<sup>23</sup>. Tres tipos de proteínas controlan la apoptosis o muerte celular programada: 1) bcl-2 (familia de proteínas anti-apoptóticas), 2) la conversión de interleuquina enzimas (ICE), es decir, las caspasas, y 3) gen supresor de tumor (p53). Las caspasas están presentes en el

citoplasma de la célula como formas inactivas llamadas pro-caspasas, que se activan durante la apoptosis. Las ERO conocidas pueden activar la pro-caspasa y conducen a la apoptosis. El gen p53 es un regulador de la transcripción que juega un papel en el control de la proliferación celular normal e induce la apoptosis <sup>24</sup>. FoxO3a, que es signatario de los factores de transcripción, puede regular el tiempo de vida de glóbulos rojos <sup>24</sup>. Kane et al. <sup>24</sup> han sugerido que bcl-2 inhibe la apoptosis mediante la reducción de la generación de ERO o su efecto, mientras que la activación de ICE puede prevenirse por los antioxidantes. A la luz de estos datos, se puede aceptar que las ERO pueden contribuir al progreso metabólico normal, de una parte del proceso de muerte celular programada.

### **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 <sup>9,25</sup>.

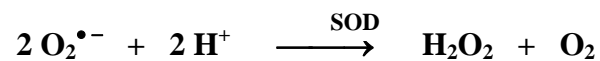
El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico y que, en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por acción de otros antioxidantes. No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los radicales libres de oxígeno <sup>7,26</sup>.

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

### 2.3.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Las enzimas para la prevención de la desnaturalización oxidativa en eritrocitos incluyen: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd)<sup>5,27</sup>.

El anión superóxido se convierte en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la superóxido dismutasa.



SOD es una familia de enzimas que comprende: CuSOD, ZnSOD, MnSOD y SOD extracelular, cuya función es la protección contra las ERO, particularmente O<sub>2</sub><sup>°-</sup><sup>6,27</sup>. Debido a la falta de mitocondrias, las enzimas CuSOD, ZnSOD desempeñan un papel mucho más importante en los eritrocitos. El zinc parece estabilizar la enzima, mientras que los átomos de cobre y el aminoácido histidina son necesarios para la actividad enzimática<sup>27</sup>.

Fisiológicamente, los eritrocitos están bien protegidos contra las ERO por abundantes Cu, Zn-SOD que neutralizan a los radicales libres, evitando así la formación de metHb<sup>5,6,27</sup>; además, la síntesis de Cu, Zn-SOD es inducida por O<sub>2</sub><sup>°-</sup>. Su actividad también aumentó en presencia de O<sub>2</sub><sup>°-</sup> con la activación del regulador de genes. El flujo de salida de oxígeno a los tejidos se reduce drásticamente, pero es lo suficiente para generar ERO como resultado de la incompleta reducción de O<sub>2</sub>. En eritrocitos, la actividad de Cu, Zn-SOD tiende a disminuir la isquemia crítica, porque la producción

de  $O_2^{\circ-}$  es mayor y va a ser menor durante la isquemia moderada. Parece razonable que la síntesis disminuida de Cu, Zn-SOD es causada por la disminución de la formación de  $O_2^{\circ-}$ . En la inflamación, la actividad del Cu se ve afectada negativamente por la actividad de esta enzima y como resultado, la resistencia al estrés oxidativo cambia. En estudios anteriores, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa de las enzimas antioxidantes en eritrocitos de fumadores<sup>28</sup>.

El daño de la célula puede ser también indirectamente debido al mismo superóxido, incluso más que a las ERO como  $OH^-$ , la formación de los cuales, a través de la reacción de Fenton, se favorece por exceso de  $O_2^{\circ-}$ <sup>6,28</sup>.

Varias investigaciones han reportado disminución de la actividad de SOD eritrocitaria durante aplicaciones terapéuticas y condiciones fisiopatológicas<sup>29</sup>. Se observó disminución de la actividad de SOD con ácido acético salicílico y antiinflamatorios no esteroideos. SOD neutraliza  $O_2^{\circ-}$  e inhibe la formación de peroxinitrito, suprimiendo así la lesión y la regulación de la biodisponibilidad de NO<sup>30</sup>.

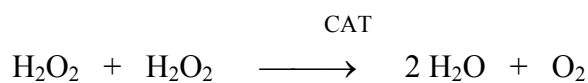
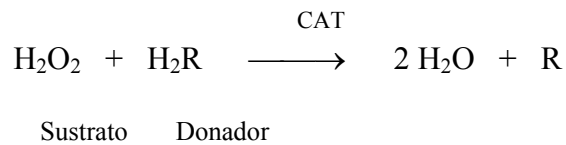
$H_2O_2$  es producido por vías metabólicas normales y existen dos sistemas enzimáticos para catalizar  $H_2O_2$  que están presentes muy activos en las células rojas humanas<sup>31</sup>.

Los bajos niveles de  $H_2O_2$  ( $M 10^{-9}$ ) se eliminan por el GSH para formar glutatión oxidado (GSSG) y agua, una reacción catalizada por GSHPx<sup>31</sup>, debido a que la reacción directa entre  $H_2O_2$  y GSH es muy lenta, reduce GSHPx a  $H_2O_2$  por oxidación de GSH a GSSG.

Las enzimas citoplasmáticas, gastrointestinales y lipofílicas son capaces de reducir los hidroperóxidos de lípidos complejos en las membranas, las isoenzimas también están presentes en las células rojas de la sangre<sup>31</sup>.



La actividad catalítica de catalasa (CAT) parece ser un caso especial de actividad de la peroxidasa en el que el donante de electrones es una segunda molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El mecanismo de acción es similar a la CAT/ SOD, en el que una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se reduce a agua y el otro oxida a oxígeno<sup>7,32</sup>.



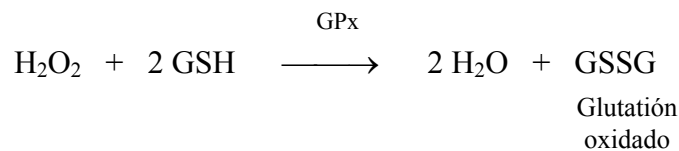
Entonces CAT y SOD reaccionan de forma sinérgica para protegerse unos a otros constatado en los estudios de hemólisis de los eritrocitos<sup>32</sup>.

Gaetani et al.<sup>33</sup> demostraron que CAT y GSHPx son igualmente activas en la desintoxicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eritrocitos. Sin embargo, varios investigadores encontraron que la actividad de GSH-dependiente de GSHPx ha sido generalmente considerada como la principal defensa contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eritrocitos.

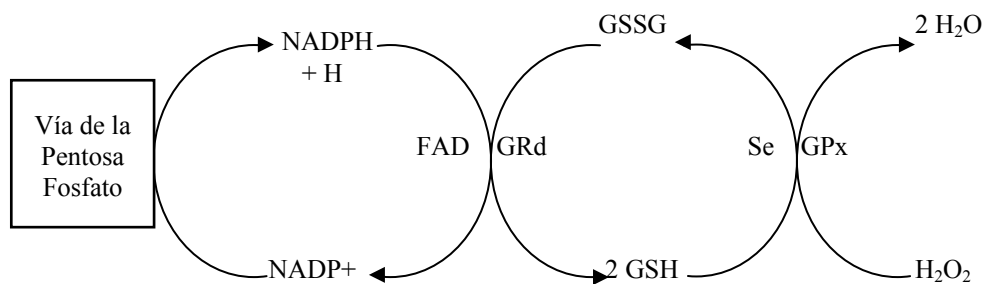
Los datos de la GSHPx deficiente en glóbulos rojos aclaran la cuestión intraeritrocitaria de oxidación de Hb y generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>33</sup>. En conclusión, GSHPx es importante para hacer frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno producido por autooxidación de Hb, mientras que la CAT juega un importante papel cuando el eritrocito está expuesto a un aumento del flujo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se podría anticipar que la actividad de la SOD elevada sería protectora contra los agentes generadores O<sub>2</sub><sup>°-</sup>. Sin embargo, las células con actividad aumentada 5 a 9 veces no mostró ninguna mejor resistencia a generadores O<sub>2</sub><sup>°-</sup>; por consiguiente, O<sub>2</sub><sup>°-</sup> es más probable que reduce Hb para regenerar oxihemoglobina. En efecto, el nivel de metHb es ligeramente superior en proporción a SOD en eritrocitos, lo cual indicaría que O<sub>2</sub><sup>°-</sup> se inhibió mediado por la reducción de metHb. Por

consiguiente, es difícil distinguir las funciones específicas de los diferentes antioxidantes en la protección del estrés oxidativo en eritrocitos <sup>34</sup>.

La glutatión-S-transferasa desempeña un papel importante en la desintoxicación de xenobióticos electrófilos tales como herbicidas, insecticidas, carcinógenos químicos y otros problemas de contaminantes ambientales orgánicos e inorgánicos. Estas enzimas catalizan la conjugación de GSH con compuestos tóxicos exógenos y endógenos o sus metabolitos, haciéndolos más solubles en agua, menos tóxicos, y más fáciles de excretar. Además, son responsables de diversos mecanismos de resistencia incluyendo quimioterapéutico o resistencia a los antibióticos<sup>35</sup>. Es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o lipoperóxido (L-OOH), utilizando el glutatión reducido (GSH) <sup>35</sup>.



El glutatión oxidado es reducido por la glutatión reductasa (GRd) que utiliza NADPH (proveniente de la vía pentosa fosfato en el eritrocito) como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH / GSSG <sup>36</sup>. (Figura 2)



Fuente:

Fuente: Adriaola M, Olivera P. <sup>4</sup>

La glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión 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 <sup>5,36</sup>.

Existen al menos tres formas de glutatión 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), 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-P es una enzima monomérica que también posee un átomo de Selenio y presenta actividad catalítica <sup>37,38</sup>.

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 <sup>38</sup>.

### **2.3.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS**

Los antioxidantes no enzimáticos se clasifican en: insolubles en agua (vitamina E,  $\beta$ -caroteno, ubiquinon, la melatonina, etc) y solubles en agua (glutatión, vitamina C, ácido úrico, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobulin, etc.).

Glutatión (GSH) es un tripéptido no proteínico que se deriva de los aminoácidos. Contiene un enlace peptídico entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de

la cadena lateral del glutamato. Su capacidad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico del resto de cisteína.

En presencia de GPx reduce el  $H_2O_2$  a agua, dando lugar a su forma oxidada (GSSG) por la formación de un puente disulfuro entre dos de estas moléculas; gracias a la enzima glutatión reductasa (GRx) es regenerado a su forma reducida en presencia de  $NADP^+$  (5,39).

Glutatión es el mayor antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, así como el mantenimiento de las vitaminas C y E en sus formas reducidas.

Las vitaminas A, C, y E proporcionan una defensa contra el daño oxidativo. La vitamina C actúa en la fase acuosa, mientras que la vitamina E actúa en la fase lipídica como una cadena antioxidante.

La vitamina C reduce el  $O_2^{\circ-}$  y lípidos de radicales peróxido, pero es también un conocido agente sinérgico de la vitamina E<sup>61</sup>. Existe como el anión enolato a pH fisiológico. Se ha demostrado su efecto protector frente a la peroxidación de lípidos de membrana de los eritrocitos. La vitamina E es el antioxidante más ampliamente distribuido en la naturaleza.

La vitamina C y E trabajan juntos para inhibir las reacciones de peroxidación lipídica de lipoproteínas y membranas en el plasma.

Los carotenoides, precursores de la vitamina A, tienen efecto antioxidante sobre el oxígeno singlete. Existe una considerable evidencia *in vitro* de la acción del  $\beta$ -caroteno sobre los radicales libres, por su propiedad antioxidante que rompe las cadenas y neutraliza al oxígeno singlete<sup>6,40</sup>.

Varios compuestos exógenos, tales como los inhibidores de la NADPH oxidasa, alopurinol y flavonoides tienen propiedades antioxidantes. Se sabe que los flavonoides

son buenos antioxidantes exógenos contra radicales libres y peroxidación lipídica iniciada en las células rojas humanas, además la actividad antioxidante de los flavonoides depende significativamente de la estructura molecular y las condiciones de iniciación <sup>41</sup>.

Muchos estudios han sugerido que los flavonoides presentan actividad biológica, incluyendo antialérgicas, antiviral, antiinflamatorias, y vasodilatadores <sup>41</sup>.

La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes *in vitro* ha sido objeto de diversos estudios que demuestran sus relaciones estructura-actividad. Más flavonoides ingeridos son ampliamente degradados en varios compuestos fenólicos, algunos de los cuales aún poseen una capacidad eliminadora de radicales.

Los flavonoides son absorbidos y sus metabolitos pueden mostrar actividad antioxidante *in vivo* que se demuestra por el aumento en el plasma del estado antioxidante <sup>41</sup>.

#### **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 <sup>42</sup>.
- ***Ceruloplasmina***. Proteína circulante portadora de cobre; oxida al ión Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> por lo que inhibe el proceso lipoperoxidativo y la reacción de Fenton dependiente de Fe<sup>2+</sup>.
- ***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.

## **2.4 CONDICIONES ESPECIALES**

### **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 la humedad del ambiente, la exposición a una mayor radiación ionizante y UV, el factor más agobiante lo representa el descenso de la presión barométrica y por ende, la disminución del oxígeno <sup>43</sup>.

Este fenómeno se conoce como hipoxia hipobárica, 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, provoca 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 <sup>2,43</sup>.

### **2.4.2 Sistemas de generación de Especies Reactivas de Oxígeno a gran altura.**

Ha sido demostrado que un aumento de oxígeno da como resultado una mayor producción de ERO mitocondrial. Además, se ha sugerido que 1-2 % del oxígeno que entra en la mitocondria, se libera como una ERO. Por otro lado, parece que la hipoxia puede conducir a estrés reductivo, que también se traduce en un aumento de la producción de EROS por el sistema mitocondrial de transporte de electrones. Las ERO generan el complejo I y complejo III de la cadena de transporte de electrones. Durante la hipoxia, menos O<sub>2</sub> está disponible para ser reducido a H<sub>2</sub>O por la citocromo c oxidasa, causando acumulación de equivalentes reductores en la secuencia respiratoria

mitocondrial. Esta acumulación se conoce como estrés reductor y esta reacción conduce a la formación de EROS por la auto-oxidación de uno o más complejos mitocondriales, como la pareja ubiquinona-ubiquinol redox. El aumento celular de NADH / NAD<sup>+</sup> se encuentra asociado a la hipoxia, estrés reductor<sup>5,6,43</sup>.

Cuando se produce una disminución considerable de oxígeno, como en la exposición a la isquemia o la presión de oxígeno muy baja, tal como altitud sobre 6000 msnm, las células tienden a generar ATP. Esta reacción se produce a través de la interacción de dos ADP, que están catalizadas por la adenilato quinasa. Este proceso también genera AMP, el cual no puede ser reciclado y es catabolizado por la hipoxantina formada y en presencia de calcio, relacionado con la xantina deshidrogenasa se puede convertir a la xantina oxidasa, que utiliza oxígeno molecular en lugar de NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones, con la consiguiente producción de xantina más anión superóxido o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>44</sup>. El sistema xantina deshidrogenasa / oxidasa es un potente generador de ERO durante las condiciones de hipoxia / reperfusión. Intermitente exposición a la altura tiene características similares a las isquemia/repercusión. Por otro lado, los modelos cambiantes de ERO y el óxido nítrico (NO) es diferente durante isquemia/reperfusión y la exposición a grandes alturas. En contraste, los niveles de isquemia/reperfusión de las ERO aumentan durante la hipoxia y pre-hipoxia y asume valores sobre el retorno a la normoxia. La aclimatación implica la regulación de inducible óxido nítrico sintasa (ONS), lo que sugiere que la hipoxia conduce a una alteración del equilibrio ERO/NO, que es finalmente restaurada durante el proceso de aclimatación<sup>4,44</sup>. Este fenómeno puede tener relevancia para las alteraciones de la microcirculación asociados con la exposición hipóxica, incluyendo el mal de montaña agudo y pulmonar de gran altitud y edema cerebral<sup>2,44</sup>.

Además de los mencionados sistemas de generación de ERO, se conoce que la radiación UV aumenta considerablemente a mayor altitud, lo que resulta en una mayor formación de ERO y esto es debido a diferentes factores, incluyendo la cadena respiratoria mitocondrial, la xantina oxidasa y la NOS<sup>2,44</sup>.

### **2.4.3. 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; 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<sup>2,45</sup>.

Uno de los parámetros más estudiados es el aumento de eritrocitos y hemoglobina, que fisiológicamente están elevados como respuesta adaptativa<sup>45</sup>. 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<sup>4,45</sup>.

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.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

El estudio se realizó siguiendo las normas de Helsinki, en 60 varones aparentemente sanos, cuyas edades estaban entre 25 a 50 años, repartidos en dos grupos experimentales: 30 varones residentes de mediana altura (Huaraz, 3050 msnm) y 30 varones residentes de nivel del mar (Lima, 154 msnm).

#### **Extracción y tratamiento de la muestra:**

La toma de muestras se realizó en ayunas, 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 3500 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 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 Hewlett Packard UV/Vis
- Centrífuga IES
- Balanza Analítica
- Cocinilla

### **3.2.2 Material de Laboratorio:**

- Pipeta Sahli
- Tubos de ensayo 12 x 75 mm
- Pipetas volumétricas y graduadas
- Micropipetas
- Fiolas
- Beakers
- Termómetro
- Gradillas
- Cronómetro

## **3.3 MÉTODOS**

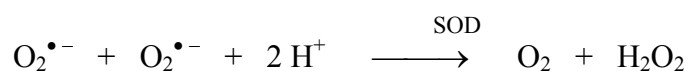
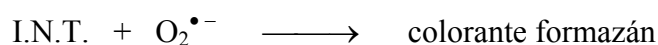
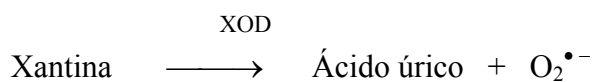
### **3.3.1 Determinación de Superóxido Dismutasa (SOD).**

Método empleado basado en el trabajo de Mc Cord y Fridovich<sup>46</sup>. 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

**Tabla 1:** Método Operatorio de Determinación de Superóxido Dismutasa.

	<b>Blanco</b>	<b>Estándar</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra*</b>	-	-	0,05 mL
<b>Estándar</b>	-	0,05 mL	-
<b>Diluyente</b>	0,05 mL	-	-
<b>Sustrato</b>	0,40 mL	0,40 mL	0,40 mL
Mezclar bien			
<b>Xantina Oxidasa</b>	0,06 mL	0,06 mL	0,06 mL

Mezclar y leer las absorbancias cada 30 segundos hasta cumplir los 3 minutos.

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

**Tabla 2:** Curva Patrón

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

$$100 - \frac{(\Delta \text{ Abs estándar o muestra/min} \times 100)}{\Delta \text{ Abs S1/min}}$$

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.

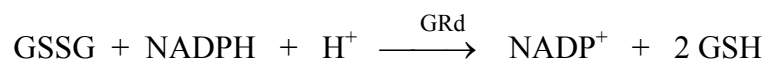
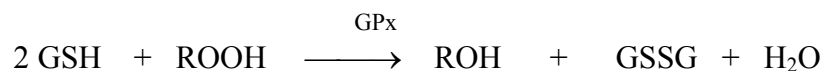
***Conversión a unidades de SOD / g de Hemoglobina:***

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

**3.3.2 Determinación de Glutación Peroxidasa (GPx).**

Este método está basado en el trabajo de Plagia y Valentine <sup>47</sup>. Se utilizó el kit de análisis RANSEL.

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



Reactivos:

- Reactivo (Glutación + Glutación 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

**Tabla 3:** Método Operatorio de Determinación de Glutación Peroxidasa.

	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra*</b>	-	0,01 mL
<b>Agua bidestilada</b>	0,01 mL	-
<b>Reactivo (Sustrato)</b>	0,50 mL	0,50 mL
<b>Cumeno</b>	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 mililitro de hemolizado (U GPx/mL.):

$$U \text{ GPx/mL.} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{Mol/Mol})}{\epsilon \times V_r \times 1000}$$

Donde:

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

$\epsilon$  : Coeficiente de extinción molar de Glutación Peroxidasa

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

Vt : Volumen total  
Vr : Volumen del hemolizado (volumen real)

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

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

### 3.3.3 Determinación de Catalasa (CAT).

Este método está basado en el trabajo de Hugo Aebi <sup>48</sup>.

Fundamento: El fundamento del método es la descomposición enzimática del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalizada por la enzima catalasa, en el cual se mide el decrecimiento de la absorbancia por espectrofotometría UV a 240 nm

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)



**Tabla 4:** Método Operatorio de Determinación de Catalasa.

	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra diluida*</b>	-	0,01 mL
<b>Agua bidestilada</b>	0,01 mL	-
<b>Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	3 mL	3 mL

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

Cálculos:

$$kU/g \text{ Hb} = \frac{\text{Abs MP} \times 1\,000\,000 \times \text{Vol. ensayo}}{E \times \text{Vol. real} \times 1000 \times g/\text{Hb}}$$

Donde:

$kU/g \text{ Hb}$  : Concentración de la enzima CAT expresada  $kU/g$  de hemoglobina

E : Coeficiente de extinción molar de la catalasa

Abs MP : Absorbancia de la muestra problema

Vol. Ensayo : Volumen del ensayo

Vol. Real : Volumen del hemolizado.

$g/\text{Hb}$  : Gramos de Hemoglobina.

### 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 <sup>49</sup>, adicionando NaOH para separar el MDA unido a las proteínas. Las sustancias reactantes 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

**Tabla 5:** Método Operativo de Determinación de Malondialdehído.

<b>Muestra (bemolizado)*</b>	0.500 mL
<b>BHT 0.2 %</b>	0,040 mL
<b>NaOH 12.5 N</b>	0,020 mL
Incubar por 30 min a 60 °C	
<b>TCA 18 %</b>	1.20 mL
Baño de hielo por 10 min	
Centrifugar (3500 rpm por 10 min)	
<b>Sobrenadante</b>	1 mL
<b>TBA 0.6 %</b>	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:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Abs}_{\text{MP}} - \text{Abs}_{\text{BL}}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_{\text{R}}} \times \frac{1}{\text{g Hb/L}} \times 10^9 \text{ nmol}$$

Donde:

$\text{Abs}_{\text{MP}}$  : Absorbancia de la muestra problema

$\text{Abs}_{\text{BL}}$  : Absorbancia del blanco

$\epsilon$  : Coeficiente de extinción de MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$V_{\text{R}}$  : Volumen real

$\text{g Hb/L}$  : 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 (R. de Drabkin):
  - Ferricianuro de potasio
  - Cianuro de potasio
  - Sterox
  - Buffer y estabilizantes no reactivos

Procedimiento:

- a) *Preparación del reactivo de trabajo*: Diluir el reactivo de Drabkin 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) En tres tubos de lectura marcados B (blanco), St (estándar) y MP (muestra problema), colocar con pipeta de *Sahli* :

**Tabla 6:** Método Operativo de Determinación de Hemoglobina.

	<b>B</b>	<b>St</b>	<b>MP</b>
<b>Sangre</b>	-	-	0,020 mL
<b>Estándar</b>	-	0,020 mL	-
<b>Reactivo</b>	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:

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia MP}$$

Donde:

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

## IV. RESULTADOS

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias y malondialdehído en sujetos de mediana altura (Huaraz, 3050 msnm) y de nivel del mar (Lima, 154 msnm) se obtuvieron los siguientes resultados:

### **Superóxido Dismutasa (SOD):**

Los valores medios de la enzima SOD a mediana altura fueron mayores ( $938.40 \pm 239.50$  U/g Hb) que a nivel del mar ( $769.30 \pm 279.9$  U/g Hb),  $p < 0,05$ .

### **Glutación Peroxidasa (GPx)**

Los valores medios de la enzima GPx a mediana altura fueron ligeramente mayores ( $65.10 \pm 25.70$  U/g Hb) que a nivel del mar ( $56.40 \pm 14.60$  U/g Hb),  $p > 0,05$ .

### **Catalasa (CAT)**

Los valores medios de la actividad de la enzima CAT a mediana altura fueron mayores ( $110.70 \pm 42.50$  kU/g Hb) que a nivel del mar ( $83.70 \pm 40.40$  kU/g Hb),  $p < 0,05$ .

### Malondialdehído (MDA)

Los valores medios de la concentración de MDA a mediana altura fueron ligeramente superiores ( $35.10 \pm 21.70 \mu\text{mol/g Hb}$ ) que los obtenidos a nivel del mar ( $27.10 \pm 6.30 \mu\text{mol/g Hb}$ ),  $p > 0,05$ .

### Actividad de antioxidantes enzimáticos y niveles de malondialdehído en eritrocitos de sujetos nativos de mediana altura (Huaraz, 3050 msnm) y de nivel del mar (Lima, 154 msnm) (Tabla 7)

	ALTITUD	Nº	MEDIA $\pm$ E.S.	P
<b>MDA</b> ( $\mu\text{moles/g Hb}$ )	LIMA	30	$27,1 \pm 1,15$	NS
	HUARAZ	29	$35,1 \pm 4.03$	
<b>SOD</b> (U/g Hb)	LIMA	30	$769,3 \pm 51,08$	< 0,05
	HUARAZ	29	$938,4 \pm 44.43$	
<b>GPx</b> (U/g Hb)	LIMA	30	$56,4 \pm 2.66$	NS
	HUARAZ	27	$65,1 \pm 4.94$	
<b>CAT</b> (kU/g Hb)	LIMA	30	$83,7 \pm 7.37$	< 0,05
	HUARAZ	29	$110,7 \pm 7.88$	

## V. DISCUSIÓN

Cuando los seres humanos están sometidos a una menor cantidad de oxígeno, como ocurre en la vida a mediana altura, el organismo desarrolla sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para regular los efectos de las especies reactivas de oxígeno, las enzimas antioxidantes endógenas, presentes en las células eritrocitarias, tienen la función de lograr un equilibrio para la conservación de la salud y evitar el estrés oxidativo<sup>2</sup>.

Un indicador sensible para la evaluación de este daño oxidativo son los eritrocitos, por lo tanto para determinar el daño que generan las EROS se utiliza la medición de la actividad de las enzimas antioxidantes presentes en los eritrocitos; los cuales son marcadores biológicos de agresiones tóxicas y oxidación en diferentes órganos y sistemas<sup>2</sup>.

En la altura, los valores de hematocrito y hemoglobina son mayores que a nivel del mar<sup>1</sup>. La hemoglobina aumentada participaría en la formación de radicales libres. La combinación de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción de Fenton) da como resultado la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el cual cumple un rol importante en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica. Además, el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), que se forma en el eritrocito por la autoxidación de hemoglobina a metahemoglobina, también puede

reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una reacción catalizada por  $\text{Fe}^{3+}$  (reacción de Haber-Weiss), lo que nos podría sugerir consecuentemente un incremento del daño oxidativo<sup>1,54</sup>.

El nivel de estrés oxidativo depende de la velocidad de generación de oxidantes y de los niveles de defensa antioxidante, los cuales están genéticamente controlados, pero están influenciados también por factores epigénéticos.<sup>32</sup> Esto sugiere la existencia de determinados factores en el medio ambiente que influirían en la elevación de la actividad de la SOD.

La enzima SOD cataliza la dismutación del ión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, evitando así que esta reaccione con el radical de óxido nítrico para formar peroxinitrito. Nuestros resultados muestran mayor actividad de la enzima SOD en sujetos de mediana altura que en los del nivel del mar, esta diferencia podría deberse ya que en un medio hipoxico hay mayor formación de ión superóxido producto de la autooxidación de hemoglobina a metahemoglobina, en respuesta el sistema antioxidante aumenta la actividad de la SOD para convertir los superóxidos altamente reactivos en peróxidos de hidrógenos menos potentes. Sin embargo nuestras observaciones sobre la respuesta de la actividad de la SOD frente al estrés oxidativo no esta de acuerdo con Seclen y col. (2006)<sup>50</sup> Estos autores informan una menor actividad de la SOD a mediana altura asociado a una menor contaminación ambiental y adaptación al medio hipóxico, estas discrepancias pueden ser debido a diferentes grupos de estudio y métodos de análisis; también consideramos que en altura además del medio hipóxico existe mayor radiación, sumado esto al estrés físico y mental propio del estilo de vida incrementa los marcadores de estrés oxidativo en el poblador nativo de mediana altura. Al mismo tiempo se encuentra apoyo en los resultados obtenidos por Sanchari y col. (2009)<sup>51</sup> quienes compararon las diferencias en el perfil antioxidante de nativos de gran altura y



residentes temporales concluyendo que en un medio hipoxico hay un incremento de los marcadores de estrés oxidativo para una mejor adaptación al medio.

En relación a la mayor actividad de la enzima CAT en los sujetos de mediana altura respecto a los sujetos de nivel del mar, esto se debería a la respuesta antioxidante del sistema SOD/CAT, el cual ante un aumento de la actividad de la enzima SOD genera mayor formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, al acumularse peróxido de hidrogeno activa la enzima CAT transformando el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno<sup>32</sup>. Podemos deducir que CAT y SOD reaccionan de forma sinérgica para protegerse uno a otro. Se encuentra apoyo en los resultados obtenidos por Cárdenas y col. (2012)<sup>3</sup> quienes concluyen una mayor actividad de CAT a grandes alturas esto le permite a la célula descomponer hidroperóxidos evitando de esta manera la reacción de Fenton. Asimismo otros estudios demuestran mayor actividad de CAT a medianas alturas, Ahumada y col. (2011)<sup>52</sup> y Rauchoca y col. (2005)<sup>53</sup>

La GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno, utilizando como agente reductor el glutatión reducido, en nuestro estudio la actividad de la GPx en sujetos nativos de mediana altura fue ligeramente superior a los sujetos de nivel del mar; esto podría deberse a que el sistema antioxidante SOD/CAT tiene mayor actividad que el sistema GPx/GRd ya que actúan en correlación inversa<sup>35</sup>; además algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral, el interferón y la interleukina-1 son capaces de inhibir la actividad de la GPx<sup>35</sup>. Considerando la importancia de la enzima GPx como antioxidante enzimático podemos deducir que su actividad aumenta a mayor altitud como lo demuestran estudios realizados por Adriazola y col. (2005)<sup>4</sup> en sujetos nativos de gran altura.

En la altura las concentraciones elevadas de hierro favorecen la reacción de Fenton y Haber Weiss, esto conlleva a la formación del ion hidroxil (OH<sup>-</sup>) radical altamente

reactivo que da inicio a la oxidación de proteínas y a la peroxidación lipídica<sup>1</sup>. Cuando la producción de EROS sobrepasa la acción de los sistemas antioxidantes produce un aumento de los procesos de oxidación, esto justificaría el ligero aumento de la concentración de MDA en los sujetos de mediana altura que en los de nivel del mar. Esta diferencia no significativa se debería al aumento de la actividad del sistema antioxidante SOD/CAT evitando la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y la peroxidación lipídica. Coincide con estudios realizados por Hsien-Hao y col. (2008)<sup>55</sup> quienes encuentran mayor concentración de MDA en sujetos expuestos a la altura y Ahumada y col. (2011)<sup>52</sup> en su estudio realizado en nueva Cajamarca.

Por lo descrito es muy importante la defensa del sistema antioxidante endógeno de los sujetos de mediana altura y existe la necesidad de seguir estudiando los efectos sinérgicos del uso de antioxidantes exógenos y su participación en la defensa de los efectos negativos causados por el estrés oxidativo.

## VI. CONCLUSIONES

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

1. Las actividades enzimáticas eritrocitarias de superóxido dismutasa (SOD) de los sujetos de mediana altura fueron ligeramente mayores que las de nivel del mar, ( $p < 0,05$ ).
2. Los sujetos de mediana altura presentan una mayor actividad eritrocitaria de catalasa (CAT) que los sujetos de nivel del mar, ( $p < 0,05$ ).
3. La actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos de sujetos de mediana altura se encuentra ligeramente elevada respecto a los sujetos a nivel del mar, aunque sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).
4. Las concentraciones de malondialdehído (MDA) en eritrocitos de sujetos de mediana altura se encuentran ligeramente elevados respecto a los sujetos a nivel del mar, aunque sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar la influencia de la biodisponibilidad de fármacos en sujetos con estrés oxidativo.
2. Determinar la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes en sujetos asmáticos.
3. Evaluar el efecto de los antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas E, A y C y su influencia en la prevención del estrés oxidativo en la altura.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Rojas A, Virhuez P, Gonzáles E.** Niveles de Ácido Úrico, Hemoglobina y Hematocrito en nativos de las grandes alturas. *Ciencia e Investigación.* 2000; 3 (2): 26 - 33.
2. **Agoston D, Hideko O, Zoltan A, Taylor A, Radak Z.** High altitude and oxidative stress. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 158 (2007): 128 – 131.
3. **Cárdenas A, Tataje L, Florentini E, Peña C, Carranza E.** Oxidación de Proteínas y Lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a grandes alturas. *Ciencia e Investigación.* 2012; 15(1): 36 – 41.
4. **Adriazola M, Olivera P.** Enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2005.
5. **Rodríguez J, Menendez J, Trujillo Y.** Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar.* 2001; 30 (1):15-20.
6. **Turrens J.** Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicos. *Antioxidantes y Calidad de Vida.* 1994; (1): 16-19.
7. **Pérez P, Pérez J.** Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar.* 1999; 29 (3): 192-198.

8. **Zentella P, Corona G.** Toxicidad del Oxígeno: Papel de los Radicales Libres en la Peroxidación de los Lípidos. BEB. 1994; 13 (3): 87 – 97.
9. **Montero M.** Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Anales de la Facultad de Medicina. 1996; 57 (4): 278 – 281.
10. **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.
11. **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): 7 – 23.
12. **Ríos M.** El Estrés Oxidativo y el Destino Celular. Revista Química Viva. 2003;2(1): 1 – 12.
13. **Cosío G, Yatacco A.** Valores de Hemoglobina en relación con la altura sobre el nivel del mar. Salud Ocupacional 1996. 13: 5 – 17.
14. **Johnson RM, Goyette Jr G, Ravindranath Y, Ho YS.** Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. Free Radic Biol Med 2005;39:1407–17.
15. **Signorini C.** Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. FEBS Lett 1995;262:165–70.
16. **Giulivi C, Davies KJ.** Mechanism of the formation and proteolytic release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in haemoglobin and red blood cells. J Biol Chem 2001;276:24129–36.
17. **Millan CG.** Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. Control Release 2004;95:27–49.

18. **Boberis A, Costa L, Junqueira V.** Envejecimiento Mitocondrial. *Revista Ciencia e Investigación.* 2000; 3 (1): 1 – 4.
19. **Ríos M.** El Estrés Oxidativo y el Destino Celular. *Revista Química Viva.* 2003;2(1): 1 – 12.
20. **Halliwell B, Gutteridge J.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, Transition metals and disease. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 9692 – 96.
21. **Martínez M.** Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica.* 1998; 39 (1): 5 – 18.
22. **Prior W, Burdon R.** Aldehydes, Hydrogen Peroxide, and Organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Chem.* 1991; 11: 41 – 46.
23. **Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W.** Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996;56:2161–6.
24. **Kane DJ, Sarafian TA, Anton R.** Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274–7.
25. **Frank J. Giordano.** Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115 (3): 500 – 508.
26. **Jacob RA.** The Integrated Antioxidant System. *Nutr. Res.* 1995; 15: 755 – 766.
27. **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): 1 – 6.
28. **Durak I, Yalcin S, Burak Cimen MY, Buyukkocak S, Kacmaz M, Ozturk HS.** Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense systems. *J Toxicol Environ Health A* 1999;56:373–8.

29. **Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK, Sukalski KA.** Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1041–9.
30. **Durak I, Burak Cimen MY, Kacmaz M, Goren D, Serdar Ozturk H, Bolgen Cimen O.** Aspirin impairs antioxidant system and causes peroxidation in human erythrocytes and guinea pig myocardial tissue. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:34–7.
31. **Scott MD, Zuo L, Lubin BH, Chiu DT.** NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood* 1991;77: 2059 – 64.
32. **Céspedes E, Rodríguez K, Llópiz N, Cruz N.** Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2000; 19 (3): 186 – 190.
33. **Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN.** Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989;73:334-9.
34. **Johnson RM, Goyette Jr G, Ravindranath Y, Ho YS.** Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 2005;39:1407–17.
35. **Cisneros E.** Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres III. Glutación peroxidasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 1997; 16 (1): 1 – 4.
36. **Cisneros E.** La Glutación reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 1995; 14 (1): 1 – 4.



37. **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.
38. **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.
39. **Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF.** The Changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem pharmacol.* 2003; 66 (8): 1499 – 503.
40. **Rojas C.** Tesis: Efecto de la restricción calórica y de hidratos de carbono sobre las enzimas antioxidantes en el hígado y el riñón de ratón. Madrid, 1992.
41. **Teixeira S, Siquet C, Alves C.** Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free Radic Biol Med* 2005;39:1099-108.
42. **Stahl W, Sies H.** Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys.* 2005; 1740(2): 101 – 7.
43. **Monge C, León F.** El reto fisiológico de vivir en los Andes. 1ra ed. Fondo Editorial UPCH. Lima, 2003.
44. **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.
45. **Cosío G, Yatacco A.** Valores de Hemoglobina en relación con la altura sobre el nivel del mar. *Salud Ocupacional* 1996. 13: 5 – 17.
46. **McCord.** Superoxide Dismutase – an Enzyme Function for Erythrocyte. *J.B.C.* 1969; 244 (22): 6049-6053.
47. **Plagia DE et al.** Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte glutathione Peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-168.

48. **Aebi H et al.** Catalase in Vivo. *Methods of Enzymatic Analysis Verlag CEIME; Weinheim* 1974: 673-678.
49. **Hong YL, Shu Y, Chang CY, Hu ML.** 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.
50. **Seclen S, Baracco R, Mohanna S.** Antioxidantes en poblaciones adultas del nivel del mar y grandes alturas: Actividad de la superoxido dismutasa. *Rev. Med. Hered.* 2006; 17 (1): 1 – 4.
51. **Sanchari S, Uday S, Omvir S, Som N.** Different adaptation patterns of antioxidant system in natives and sojourners at high altitude. *Respiratory physiology and neurobiology* 167 (2009): 255 – 260
52. **Ahumada D, Bardales M.** Perfil enzimatico antioxidante en habitantes de nueva Cajamarca – San Martin. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2011.
53. **Rauchoca H, Vakurkova M, Koudelova J.** Developmental changes of erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia. *Rev. Physiol* 2005; 54: 527-532.
54. **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.
55. **Hsien-Hao H, Chih.Lu H, Horng-Chin Y, Woei-Yau K,Chu-Dang T, Hung-Tsang D, Chun-I H.** Oxidative stress and erythropoietin response in altitude exposure. *Clin Invest Med* 2008; 31 (6): 380 – 385.