

ENZIMAS ANTIOXIDANTES ERITROCITARIAS EN SUJETOS NATIVOS DE LAS GRANDES ALTURAS

Antioxidant Enzymes Eritrocitarias in Native People of High Altitude

Marco Adriazola J.¹, Paola Olivera P.¹, Haydée Zúñiga C.², Edison Nina C.³ y Elizabeth Carranza A.²

¹Departamento Académico de Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

²Instituto Nacional de Biología Andina, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos

³Hospital II Pasco - ESSalud

RESUMEN

Se determinó los niveles de las enzimas antioxidantes: glutatión 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) y 30 residentes de nivel del mar (Lima, 150 m). Se encontró niveles eritrocitarios de GPx mayores en los nativos de altura que en los de nivel del mar ($p < 0,001$). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para la SOD en los nativos de altura y en los de nivel del mar. La actividad de la CAT fue menor en los sujetos de altura en relación con los de nivel del mar ($p < 0,001$). Los niveles de MDA en los nativos de altura también fueron menores que los obtenidos a nivel del mar ($p < 0,001$). Se concluye que la glutatión peroxidasa es la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂ y que la formación de hidroperóxidos en los eritrocitos de habitantes de las grandes alturas estaría suficientemente neutralizada por esta enzima, a juzgar por el menor nivel de TBARS encontrado.

Palabras Clave: Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, radicales libres malondialdehído, altura.

SUMMARY

It was determined the levels of antioxidant enzymes: Glutathione Peroxidase (GPx), Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT), and the concentration of Malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation in erythrocytes of 60 apparently healthy people: 30 residents at high altitude (Cerro de Pasco, 4340 m) and 30 residents at sea level (Lima, 150 m). We found erythrocyte GPx levels higher in high altitude natives than in the sea level ones ($p < .001$). No statistically significant difference was found between the values obtained for SOD in high altitude natives and those of sea level. The CAT activity was lower in subjects of high altitude in relation to those of sea level ($p < .001$). High altitude native MDA levels also were lower than those obtained at sea level ($p < .001$). We concluded that Glutathione Peroxidase is the main antioxidant enzyme for the detoxification of H₂O₂ and that the formation of hydroperoxide in erythrocytes of high altitude inhabitants would be sufficiently neutralized by this enzyme, judging by the lower level of TBARS found.

Keywords: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, malondialdehyde, Free radicals, high altitude.

INTRODUCCIÓN

Los eritrocitos son una fuente constante de radicales superóxido, debido a la tendencia de la hemoglobina a autooxidarse, y también son muy susceptibles a la peroxidación lipídica inducida por radicales libres (RL) debido a que la membrana eritrocitaria es rica en ácidos grasos poliinsaturados (1,2). La peroxidación de proteínas

y lípidos, puede producir cambios degenerativos en la hemoglobina y causar alteraciones profundas en la organización estructural y funciones de la membrana eritrocitaria incluyendo una disminución de la fluidez, un incremento de la permeabilidad de la membrana e inactivación de enzimas unidas a membrana (3-5).

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 en el número de hematíes, niveles de hemoglobina y hematocrito, como mecanismo de adaptación (6-9).

El aumento de la concentración de hemoglobina generaría a su vez, un incremento en su autooxidación y por lo tanto, un incremento en la producción del radical superóxido. Se cree que el aumento de Hb involucraría la formación de especies reactivas de oxígeno mediante la producción de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton y por 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 propiedad del hierro dentro del hem, de interactuar con los lipoperóxidos, localizados en el medio hidrofóbico de la membrana (2,5).

Para evitar el desequilibrio redox y el daño oxidativo de las moléculas biológicas existe una amplia gama de defensas enzimáticas y no enzimáticas. El primer mecanismo de defensa para prevenir el daño oxidativo es el secuestro directamente de las especies reactivas. Este sistema de defensa incluye las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx) (10-13).

Considerando lo mencionado, el propósito del presente trabajo es evaluar los niveles de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa como antioxidantes y el nivel de malondialdehído (MDA) como un indicador de la peroxidación lipídica, en eritrocitos de sujetos nativos de las alturas (Cerro de Pasco, 4340 m).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó siguiendo las normas de Helsinki, en 60 sujetos aparentemente sanos

distribuidos en dos grupos experimentales: 30 estudiantes universitarios residentes en la altura (Cerro de Pasco, 4340 m) y 30 estudiantes universitarios residentes de nivel del mar (Lima, 150 m), cuyas edades están comprendidas entre 20 y 30 años.

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. Las muestras de Cerro de Pasco fueron transportados en refrigeración hacia la ciudad de Lima para ser analizadas en el laboratorio del "Instituto Nacional de Biología Andina" en Lima.

La sangre 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).

La actividad de la superóxido dismutasa fue medida espectrofotométricamente a 550 nm usando un kit comercial de Ransod (Catálogo N° SD 125, Crumlin, UK). Este kit está basado en el método de Mc Cord and Fridovich (14). La actividad de glutatión peroxidasa se determinó utilizando el kit comercial RANDOX (Catalogo N° RS 505, Crumlin, UK), el método está basado en el trabajo de Plagia y Valentine (15) que mide la oxidación del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados de ambas enzimas se expresan como U/g Hb. La actividad de la catalasa fue estimada por el método de Aebi (16), que se basa en que la descomposición enzimática del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y puede ser medida directamente por decrecimiento de la absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002 \text{ litros mM}^{-1} \text{ mm}^{-1}$). La actividad de la enzima se determinó midiendo el consumo de H_2O_2 en un medio que contenía 2.9 mL de sustrato (H_2O_2 0.05 % en buffer de fosfatos 50 mM pH 7) y calculando la constante de velocidad de pseudo primer orden (k). El contenido de catalasa se expresó como $K_{\text{CAT}}/\text{g Hb}$.

El contenido de MDA en eritrocitos fue evaluado como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante una técnica espectrofotométrica descrita en el trabajo de Hong, Yeh, Chang y Hu (17), donde se adiciona NaOH para separar el MDA unido a las proteínas. Las sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico fueron calculadas usando el coeficiente de extinción molar $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresan como $\eta\text{moles/gHb}$.

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

Los resultados obtenidos en ambos grupos fueron expresados en términos de promedios y desviaciones estándar. Para evaluar las diferencias entre ambos grupos se aplicó la prueba t de student. Todo resultado cuyo valor de p es menor que 0.05 se considera significativo.

RESULTADOS

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de altura y de nivel del mar se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 1).

Los valores medios de la enzima SOD en altura fueron ligeramente mayores ($4140,6 \pm 1147,7 \text{ U/g Hb}$) que a nivel del mar ($4104,4 \pm 1917,9 \text{ U/g Hb}$), sin diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Los valores medios de la enzima GPx en la altura fueron mayores ($66,9 \pm 9,0 \text{ U/g Hb}$) que a nivel del mar ($37,78 \pm 8,87 \text{ U/g Hb}$), ($p < 0,001$). Los valores medios de la actividad de la enzima CAT en altura fueron menores ($275,3 \pm 44,2 \text{ k/g Hb}$) que a nivel del mar ($414,3 \pm 81,1 \text{ k/g Hb}$), ($p < 0,001$).

Los resultados de los valores medios de MDA en altura fueron menores ($8,6 \pm 1,9 \eta\text{mol/g Hb}$) que los obtenidos a nivel del mar ($11,2 \pm 1,6 \eta\text{mol/g Hb}$), ($p < 0,001$).

Tabla 1.

Niveles promedio de indicadores de estrés oxidativo en sujetos nativos de altura y a nivel del mar

	NIVEL DEL MAR		ALTURA		P
	n = 30		n = 30		
	Media	DS	Media	DS	
SOD (U/g Hb)	4104,4	1917,9	4140,6	1147,7	n.s
GPx (U/g Hb)	37,8	8,8	66,9	9,0	< 0,001
CAT (k/g Hb)	414,3	81,1	275,3	44,2	< 0,001
MDA ($\eta\text{mol/g Hb}$)	11,2	1,6	8,6	1,9	< 0,001

SOD: Superóxido dismutasa, GPx: Glutathion peroxidasa, CAT: Catalasa, MDA: Malondialdeído.

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, que no obstante pueden no ser del todo eficientes en lo concerniente a los procesos peroxidativos (6-9)

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 (2). En cuanto a los efectos de la hipoxia sobre las enzimas antioxidantes presentes en el organismo, diversas observaciones preliminares indican un incremento de la actividad de tales enzimas en estados de hipoxia tanto aguda como crónica (18-21).

En relación a los niveles de la enzima superóxido dismutasa, nuestros resultados nos muestran que los valores son similares en la altura y a nivel del mar. Esto indicaría que no se sería necesario un incremento de esta enzima para dismutar al radical libre superóxido formado en condiciones de hipoxia o que la actividad de la enzima podría estar condicionada a la acción de otros antioxidantes, comportamiento que coincide con lo reportado en otras investigaciones (23,24).

Nuestros resultados en relación a la actividad de la enzima glutatión 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 (8,9). 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 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 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.

En este sentido, cabe destacar que la GPx es más eficiente frente al estrés oxidativo que la catalasa, razón por la cual la GPx constituye un importante mecanismo de defensa. La GPx posee una mayor afinidad para descomponer el peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión, 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 (2). 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 las membranas (5).

La bibliografía no reporta valores normales de referencia para malondialdehído (MDA) en eritrocitos, los valores dependen del método utilizado para su determinación. Distintos procedimientos dan diferentes resultados (17,25). 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 (26,27) 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Trotta R. Sullivan S. Stern A.** 1983. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of haem- and glutathione-dependent decomposition of t-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid peroxidation and haemolysis. *Biochem J.* 212(3): 759-772
2. **Cimen M.** 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* 390: 1-11
3. **Halliwell B. Gutteridge J.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, Transition metals and disease. *Biochem J.* 219: 1-14
4. **Gutteridge J. Halliwell B.** 1990. The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Trends Biochemical Science* 15: 129-135
5. **Nagababu E. Rifkind J.** 2000. Structural Basis of Peroxide mediated changes in human hemoglobin: Superoxide production and Heme degradation. *Biochemistry* 39:12503-12511
6. **Monge C. León-Velarde F.** 2003. El reto fisiológico de vivir en los Andes. 1ra. ed. Fondo Editorial UPCH. Lima.
7. **González G. Villena A.** 1998. Aclimatación y adaptación a las grandes alturas. *Acta Andina* 7: 17-23
8. **González G.** 1993. Contribución Peruana a la Hematología en poblaciones de la altura. *Acta Andina* 2: 213- 225
9. **González G. Tapia V.** 2007. Hemoglobina, hematocrito y adaptación a la altura: Su relación con los cambios hormonales y el período de residencia multigeneracional. *Rev. Med* 15: 80-93
10. **Zachara B. Gromadzińska J. Wąsowicz W. Zbróg Z.** 2006. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Biochim Pol.* 53:663-77
11. **Matés J. Aledo J. Pérez-Gómez C, Esteban del Valle A, Segura J.** 2000. Interrelationship between oxidative damage and antioxidant enzyme activities: An easy and rapid experimental approach. *Biochemical Education* 28: 93-95
12. **Johnson P.** 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: Effects of exercise and hypertension. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 133: 493-505
13. **Kirkman H. Gaetani G.** 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* 32(1): 44-50
14. **McCord J. Fridovich I.** 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-55
15. **Plagia D. Valentine W.** 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab Clin Med* 70: 158-169.
16. **Aebi H.** 1984. Catalasae in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126
17. **Hong Y. Yeh S, Chang C, Hu M.** 2000. 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* 33(8): 619-625.
18. **Magalhaes J. Ascensao A. Soares J. Neuparth M. Ferreira R. Oliveira J. Amado F, Duarte J.** 2004. Acute and severe hypobaric hypoxia-induced muscle oxidative stress in mice: The role of glutathione against oxidative damage. *European Journal of Applied Physiology* 91(2-3): 185-191
19. **Rauchová H. Vokurková M. Koudelová J.** 2005. Developmental Changes of Erythrocyte Catalasae Activity in Rats Exposed to Acute Hypoxia. *Physiol. Res.* 54: 527-532

Enzimas Antioxidantes Eritrocitarias en Sujetos Nativos de las Grandes Alturas

20. **Maiti P. Singh S, Sharma A. Muthuraju S. Banerjee P. Ilavazhagan G.** 2006. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International* 49: 709-716
21. **Behn C. Araneda O. Llanos A. Celedón G. González G.** 2007. Hypoxia-related lipid peroxidation: Evidences, implications and approaches. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 158: 143-150.
22. **Montero M.** 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Anales de la Facultad de Medicina* 57: 278-281.
23. **Perales M. Torres C.** 2002. Niveles de MDA y catalasa en tejidos de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM, Lima-Perú.
24. **Pajuelo M. Yamada L.** 2003. Enzimas Antioxidantes en cerebro de cobayos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM, Lima-Perú.
25. **Pérez P. Pérez J.** 1999. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar* 29(3): 192-198.
26. **Mataix J. Quiles J. Huertas J. Battino M. Mañas M.** 1998. Tissue Specific Interactions of Exercise, Dietary Fatty Acids, and Vitamin E in Lipid Peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 511-521.
27. **Chang C. Huang H. Tseng H. Hsuuw Y. Tso T.** 2007. Interaction of vitamin E and exercise training on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscles. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 39-45.