

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIO QUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos
durante la exposición a las grandes alturas (4540 m)**

TESIS

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Anthony Max Cárdenas Fernández

ASESOR

Amelia Elizabeth Carranza Alva

Lima – Perú

2007

Este trabajo de tesis se lo dedico a:

*Mi Alma Máter,
por acogerme durante
todos estos años.*

*Las Dras. Oyola, Gonzales,
Zúñiga, Zavaleta y Carranza;
por sus enseñanzas dentro y
fuera de las aulas.*

*Mis grandes amigos de Colegio
y de la Universidad, cuya amistad
perdurará en el tiempo.*

Agradezco infinitamente

*A mis padres Filemón e Isabel,
quienes siempre me apoyan incondicionalmente
en este camino de la vida*

*A mis hermanos: Paul, Rosa,
Sandra y Piero ... gracias por
su paciencia y por siempre
estar allí.*

*Al C.I. "Instituto Nacional de Biología Andina",
donde se realizó este trabajo de investigación.*

*Y en especial a mi asesora
Q.F. Elizabeth Carranza, quien me brindó su
conocimiento, ayuda, asesoría, amistad
y sus consejos.*

INDICE

- I. ABREVIATURAS
- II. RESUMEN
SUMMARY
- III. INTRODUCCIÓN
- IV. GENERALIDADES
 - 4.1 RADICALES LIBRES
 - 4.2 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 4.3 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS
 - 4.3.1 FOSFOLIPASA A₂
 - 4.3.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA
 - 4.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES
 - 4.4.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES
 - 4.4.1.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)
 - 4.4.1.2 CATALASA (CAT)
 - 4.4.1.3 GLUTATION PEROXIDASA (GPx)
 - 4.4.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS
 - 4.4.2.1 GLUTATIÓN
 - 4.4.2.2 VITAMINA E
 - 4.4.2.3 VITAMINA C
 - 4.5 ALTURA E HIPOXIA HIPOBÁRICA
- V. MATERIALES Y MÉTODOS
 - 5.1 MATERIALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL
 - 5.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

5.2 MEDICIONES

5.2.1 DETERMINACIÓN DE CUERPOS CARBONÍLICOS

5.2.2 DETERMINACIÓN DE FOSFOLIPASA A₂ (FLA₂)

5.2.3 DETERMINACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS

5.2.4 DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

5.2.5 DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

5.2.6 DETERMINACIÓN DE CATALASA (CAT)

5.2.7 DETERMINACIÓN DE GLUTATION PEROXIDASA (GPx)

5.2.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

5.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

VI. RESULTADOS

VII. DISCUSIÓN

VIII. CONCLUSIONES

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I. ABREVIATURAS

ATC	---	Ácido tricloroacético.
CAT	---	Catalasa.
CC	---	Cuerpos carbonílicos.
EROs	---	Especies reactivas del oxígeno.
FLA ₂	---	Fosfolipasa A ₂ .
GPx	---	Glutation peroxidasa.
GSH	---	Glutación.
GSSG	---	Glutación oxidado.
MDA	---	Malondialdehído.
pO ₂	---	Presión parcial de oxígeno.
PUFA	---	Ácido graso poliinsaturado.
RL	---	Radicales libres.
RO [•]	---	Radical alcoxil.
ROO [•]	---	Radical peroxil.
ROOH	---	Hidroperóxido.
LOOH	---	Hidroperóxido lipídico.
SOD	---	Superóxido dismutasa.
TBARS	---	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.
VitE	---	Vitamina E.
VitC	---	Vitamina C.
2-ME	---	2-mercaptoetanol.
2,4-DNPH	---	2,4-dinitrofenilhidrazina.

II. RESUMEN

Se evaluó el efecto del tiempo de exposición a las grandes alturas sobre la oxidación de proteínas y lípidos del tejido cerebral de cobayos nativos del nivel del mar trasladados a las grandes alturas (Morococha, 4540 m), y sacrificados los días 1, 3, 7 y 14 después de su arribo. Se determinó los niveles medios de cuerpos carbonílicos (CC), malondialdehído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) como marcadores de la oxidación de proteínas y lípidos respectivamente; así como, las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) y fosfolipasa A₂ (FLA₂) como mediadora de la peroxidación lipídica. Se encontró niveles de CC, LOOH y MDA incrementados al primer día; CC disminuyó por debajo del control al tercer día, LOOH mantuvo la tendencia a disminuir y MDA mantuvo sus niveles altos. Las actividades de las enzimas antioxidantes: GPx y CAT incrementaron desde el primer día; la actividad de SOD aumentó hasta el tercer día disminuyendo posteriormente; la actividad de FLA₂ aumentó hasta el tercer día. Los resultados indican que la exposición por diferentes tiempos a las grandes alturas influye directamente en el proceso de oxidación de proteínas y lípidos. La disminución de los niveles de CC podría deberse a la activación del sistema proteolítico, en especial de las proteasas dependientes de Ca⁺² como las calpaínas o del sistema proteasomal, las cuales degradarían las proteínas dañadas por las EROs. La exposición a la altura influye además en la actividad de las enzimas antioxidantes, especialmente en GPx, que juega un rol importante en la detoxificación de LOOH, lo que explicaría la tendencia a disminuir al final del tiempo de estudio.

Palabras clave: oxidación de proteínas, peroxidación lipídica, antioxidantes, altura, cerebro.

SUMMARY

It was determined the effect of high-altitude exposition time (Morococha - 4540 m) on protein and lipid oxidation from brain of level-sea native guinea pig for different times (1,3,7 and 14 days). It was measured the level of carbonyl groups (CC), malondialdehyde (MDA) and lipids hydroperoxydes (LOOH) as protein and lipid oxidation markers respectively. Also, the activity of antioxidants enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and phospholipase A₂ (PLA₂) a mediator of lipid peroxidation were evaluated. The results showed an increase of the CC, LOOH and MDA levels during the first day; CC decreased below the control levels by the third day, LOOH level had a decrease trend in time and MDA kept its higher levels. The activity of both antioxidant enzymes GPx and CAT, increased since the first day. Moreover, the activity of SOD showed an increase up to third day followed by a decrease; the activity of PLA₂ increased up to the third day. The dates recorded indicated that the expositions at altitudes for different times affect directly the oxidative process of both protein and lipid. The decrease on the CC level could be caused by the activation of the proteolytic system, especially the activation of calcium-dependent proteases as calpains or the proteasomal system which could degrade damaged proteins by EROs. The exposition of altitude might affect the activity of antioxidant enzymes, especially GPx, which could play an important role in the detoxification of LOOH.

Key words: Oxidation of proteins, lipid peroxidation, antioxidants, altitude, brain.

III. INTRODUCCIÓN

En el Perú, un considerable porcentaje de la población vive o se desplaza temporalmente por motivos de trabajo, turismo, deporte, etc. entre 2400 y 4300 m., ambiente donde la presión barométrica desciende de manera exponencial en función de la altura, disminuyendo la presión parcial de O₂, fenómeno denominado hipoxia hipobárica^(9,10). La exposición aguda a las grandes alturas conlleva a una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos, etc.; pudiendo producir desde síntomas, que en conjunto se denominan “mal de montaña agudo”, hasta complicaciones mayores como edema pulmonar, edema cerebral y la muerte⁽¹⁰⁾.

El oxígeno, elemento imprescindible para los organismos aerobios, puede también alterar los sistemas biológicos a través de una producción incontrolada de radicales libres derivados del oxígeno (O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•], ROO[•], RO[•]), que dañan las macromoléculas y alteran los procesos celulares⁽¹⁾.

Las proteínas y lípidos son considerados blanco de la acción de las EROs y se comportan además como generadores y propagadores de estas sustancias dañinas⁽²⁾. El efecto de las EROs sobre las proteínas produce la aparición de grupos carbonílicos (marcadores de oxidación de proteínas), así como hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y malondialdehído (MDA) en el proceso de peroxidación lipídica^(2,3,4,5).

El cerebro debido a sus niveles de hierro, requerimientos energéticos y consumo de oxígeno elevados es un órgano sensible al ataque de diferentes agentes estresantes; además, contiene altas concentraciones de calcio y de ácidos grasos poliinsaturados que son particularmente vulnerables al ataque de los RLO^(6,7,8).

La exposición aguda a las grandes alturas produce un aumento de EROs, conllevando a daños sobre las proteínas y lípidos. Así mismo, se ha descrito un incremento de la producción de indicadores de estrés oxidativo en músculo, sangre, orina y en diferentes tejidos en respuesta a la hipoxia⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Sin embargo, son escasos los estudios sobre el efecto de la exposición aguda a las grandes alturas sobre el metabolismo oxidativo cerebral.

Otros factores potenciales que contribuirían a la generación de EROs por exposición a las alturas son: aumento de la luz ultravioleta y de niveles de catecolaminas, disminución de la temperatura, etc.^(9,10,11).

Por lo expuesto, hemos considerado de interés evaluar el efecto del tiempo de exposición a las grandes alturas sobre la oxidación de proteínas y lípidos del tejido cerebral de cobayos nativos del nivel del mar al ser trasladados a la ciudad de Morococha (4540 m).

IV. GENERALIDADES

4.1 RADICALES LIBRES

Los radicales libres son átomos no metálicos y moléculas en los cuales uno de los átomos presenta una valencia no ocupada, que consiste de un electrón no compartido. Por ejemplo en un radical libre, el carbono aparece como trivalente en vez de tetravalente, el nitrógeno como divalente en vez de trivalente y el oxígeno como monovalente en vez de divalente.

La presencia de uno o más electrones no apareados confiere a la especie química una alta reactividad, pues los radicales libres tienden a atraer hacia sí un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica⁽¹⁾.

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor, incluyendo moléculas no radicales, pudiendo ceder o captar electrones o simplemente unirse a ella convirtiéndola en un nuevo radical libre, desatándose una reacción en cadena que sólo se detiene al reaccionar dos radicales libre entre sí⁽¹⁵⁾.

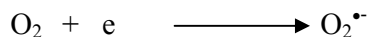
La clasificación de los radicales libres obedece al tipo de grupo funcional presente en la molécula, teniendo así radicales libres con centros activos de oxígeno, azufre, fósforo, nitrógeno o carbono.

El mecanismo más frecuente por el cual se originan los radicales libres en los organismos vivos es por la adición de un electrón a una molécula estable, siendo la fuente más importante las reacciones bioquímicas de oxido-reducción univalentes en las que interviene el oxígeno⁽¹⁶⁾.

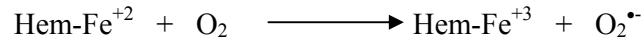
Las especies reactivas del oxígeno (EROs) tienen su origen en la reducción univalente del O₂, dando origen en primer lugar al *radical superóxido* (O₂^{•-}).

La fuente del radical O₂^{•-} es diversa, destacando:

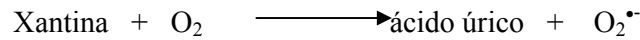
- La cadena transportadora de electrones en la mitocondria.



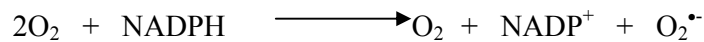
- Autooxidación de la hemoglobina.



- Acción enzimática, por ejemplo la xantina oxidasa.



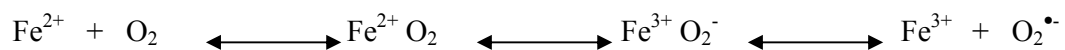
- Eclósión respiratoria de los fagocitos.



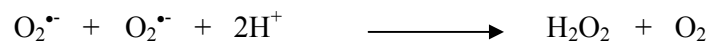
- Formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por oxidación de sustratos endógenos y exógenos en el retículo endoplasmático.

- Autooxidación de pequeñas moléculas como la adrenalina, tetra-hidrobiopterina, tioles, FMN y FAD⁽¹⁾.

A pH fisiológico, los iones ferrosos (Fe^{2+}) en presencia de oxígeno molecular y de iones fosfatos (PO_4^{2-}) existen temporalmente antes de su autooxidación a su estado férrico (Fe^{3+}). En este proceso de cambio del estado ferroso al férrico, un electrón es transferido del Fe^{2+} al oxígeno dando lugar al radical superóxido.

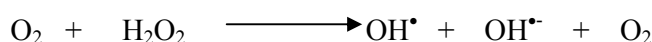


El $\text{O}_2^{\bullet-}$ desaparece rápidamente en soluciones acuosas por su reacción de dismutación dando origen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al oxígeno molecular, esta reacción es catalizada in vivo por acción de la enzima superóxido dismutasa.



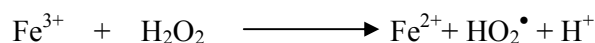
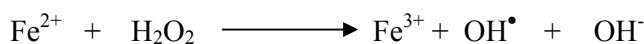
El *peróxido de hidrógeno* puede ser formado directamente por la transferencia de dos electrones al O_2 en reacciones catalizadas por la urato oxidasa, glucosa oxidasa y ácido d-amino oxidasa. El H_2O_2 es un débil oxidante y un débil agente reductor que es

relativamente estable en ausencia de iones de metales de transición. Se mezcla fácilmente con agua y es tratado como molécula de agua por el cuerpo, difundiendo rápidamente a través de las membranas de la célula. Aunque el H_2O_2 no es propiamente un radical libre, su importancia radica en que en presencia de metales de transición como hierro y cobre, en un proceso de reducción trivalente del oxígeno, puede dar lugar al radical hidroxilo, también puede reaccionar con iones cloruro en presencia de mieloperoxidasa y generar ácido hipocloroso (HClO) que atacaría a los enlaces peptídicos. Así mismo, el H_2O_2 sería removido *in vivo* por la catalasa y/o la glutatión peroxidasa⁽¹⁷⁾.

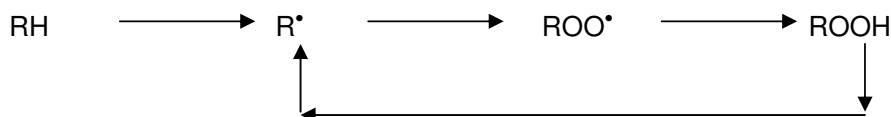


Se cree que la especie dañina no es el $\text{O}_2^{\bullet-}$ sino que sería el *radical hidroxilo* (OH^\bullet), el cual es un agente oxidante extremadamente agresivo que puede atacar a la mayoría de las moléculas biológicas, especialmente a las proteínas y lípidos de las membranas celulares^(1,16).

El OH^\bullet se origina intracelularmente en las mitocondrias, en la cadena respiratoria, por la reducción univalente del peróxido de hidrógeno ó también por la combinación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en la reacción de Fenton-Haber-Weiss. Esta reacción es termodinámicamente favorable y cinéticamente muy lenta por lo que necesita un catalizador metálico como el hierro o cobre^(17,18).



Entre los radicales libres secundarios u orgánicos destaca el radical peroxilo (ROO^\bullet), formado a partir de hidroperóxidos orgánicos como lípidos o por pérdida de un átomo de hidrógeno de los hidroperóxidos orgánicos (LOOH) o de moléculas estables a la cual una EROs le arrebató un hidrógeno^(1,16,18,19).



4.2 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas celulares están sometidas a un proceso de recambio continuo (síntesis/degradación), considerando la degradación intracelular de proteínas como el proceso catabólico por el cual una proteína sustrato es fragmentada hasta sus aminoácidos constitutivos. Los mecanismos degradativos, aparte de ser los responsables del recambio basal de proteínas en condiciones metabólicas normales, intervienen en otros muchos procesos celulares tales como: crecimiento, diferenciación tisular, degradación de las proteínas de los alimentos, defensa inmunitaria, activación de hormonas, coagulación sanguínea y determinados procesos patológicos como en los procesos de oxidación⁽¹⁵⁾.

Las proteínas son consideradas como blanco de la acción de los radicales libres y también pueden comportarse como generadores y propagadores de estas sustancias dañinas. Las proteínas intra y extracelulares de células aeróbicas serían oxidadas por los radicales libres liberados de los procesos redox y que en la mayoría de los casos, las modificaciones producidas por éstos marcarían a las proteínas para su degradación^(2,15).

El daño oxidativo de las proteínas tienen una química muy compleja, produciendo la aparición de numerosos grupos carbonílicos y otras alteraciones tales como una disminución de la fluorescencia debido a la destrucción de los aminoácidos triptófano y tirosina, cambios en el punto isoeléctrico por modificaciones de los grupos R de los aminoácidos, incremento del peso molecular por formación de asociaciones intramoleculares covalentes o hidrofóbicos, y disminución del peso molecular por ruptura del esqueleto peptídico^(1,2,15).

Los daños a las proteínas causados por los radicales libres se inician por la liberación de un electrón, por reacción con un ión metálico y la autooxidación dependientes de lípidos y de azúcares. La oxidación de las proteínas es básicamente dependiente de los radicales $O_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet} ⁽⁴⁾.

Las proteínas sufren oxidación de sus aminoácidos más sensibles, como: cisteína, triptófano, valina, fenilalanina y metionina. Las proteínas están también sometidas a una glicosilación no covalente por el ataque de un radical de glucosa o de ascorbato en presencia de metales de transición. Por ejemplo, los aminoácidos azufrados como la cisteína y metionina generan la formación de disulfuros que pueden ocasionar el establecimiento de puentes covalentes cruzados entre proteínas o subunidades con formación de agregados. Los aminoácidos lisina e histidina forman grupos aldehídos, lo

cual puede ocurrir también en residuos de aspártico, prolina y arginina; dando lugar a un incremento de grupos carbonílicos en las proteínas agredidas (ver Figura N° 1)^(2,4,5).

Diferentes sistemas han demostrado la capacidad del 4-hidroxinonal (4HNE) y del MDA, productos finales de la peroxidación lipídica, de poder unirse covalentemente a diversas proteínas, dichas proteínas alteradas muestran una gran susceptibilidad a la proteólisis^(5,20).

Se ha observado que las células expuestas a las acciones de los radicales oxidantes experimentan una violenta proteólisis, como resultado de una activación de las enzimas proteolíticas, un incremento de la susceptibilidad a la proteólisis de las proteínas oxidativamente modificadas o de ambos procesos.^(1,4,5)

4.3 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

4.3.1 FOSFOLIPASA A₂ (EC 3.1.1.4)

La fosfolipasa A₂ pertenece a una familia de enzimas ampliamente distribuida en la naturaleza, cuya acción consiste en promover la hidrólisis de la unión éster en la posición sn-2 de los fosfoglicéridos, obteniéndose como productos: lisofosfatido y un ácido graso libre como el ácido araquidónico que da origen a mediadores de los procesos inflamatorios como las prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos (ver Figura N° 2); jugando así esta enzima un rol clave en el recambio de los fosfolípidos de membranas.

Existen dos grandes clases de FLA₂, las primeras son del tipo intracelular o citosólicas con pesos moleculares elevados (45-80 Kda) y las segundas que son las de secreción, tienen un peso molecular menor (14-18 Kda).

Las FLA₂ funcionan con una pseudo triada catalítica en la cual la serina es remplazada por una molécula de agua. También, todas tienen un sitio de unión para el ion Ca⁺², el cual es importante para la presentación del sustrato a la triada Tir-Asp-Ser. El Ca⁺² estabiliza el estado de transición, a la vez que participa directamente en la catálisis⁽²⁰⁾.

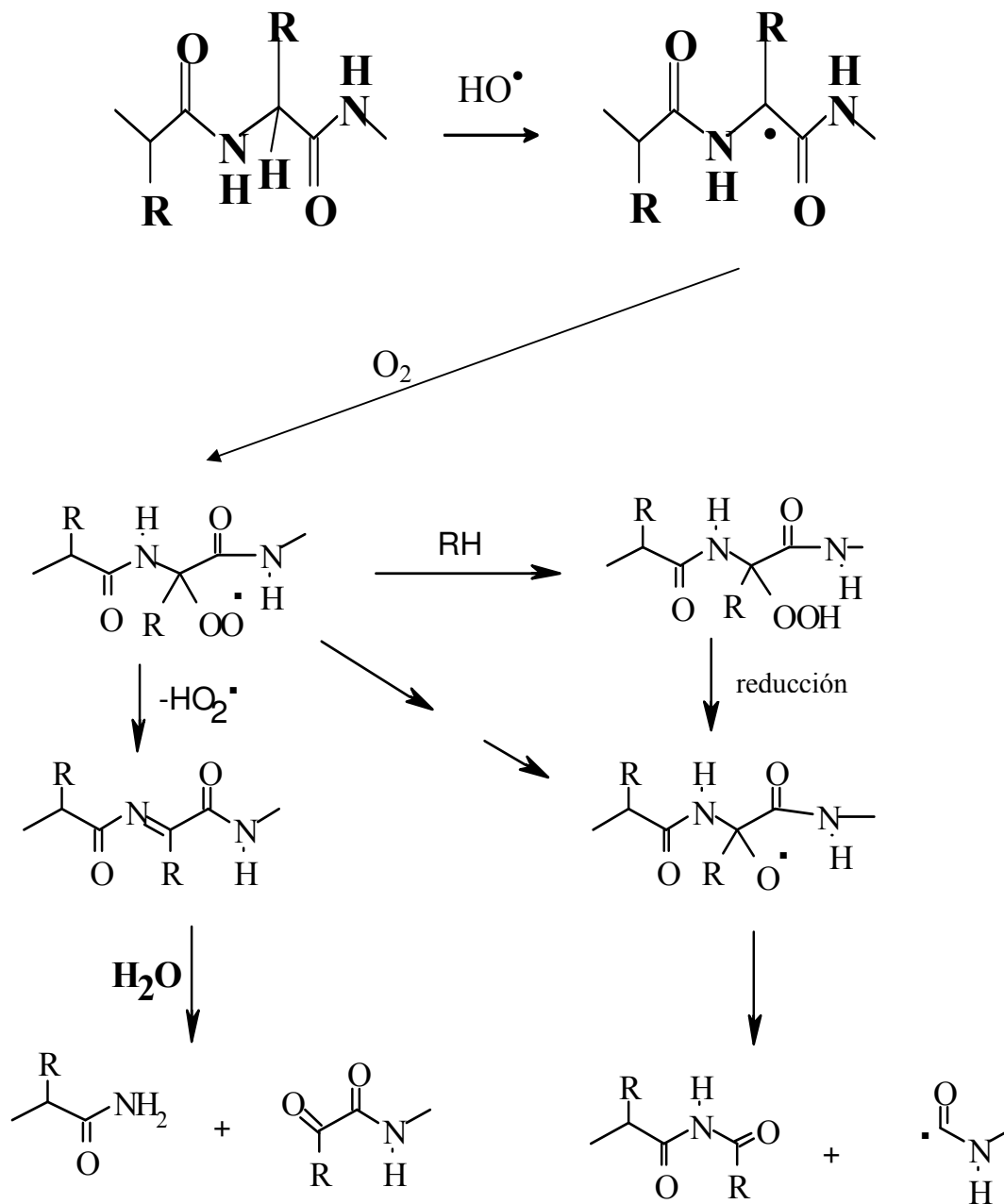


Figura N° 1 : Oxidación de proteínas por efecto de los RL y la formación de cuerpos carbonílicos

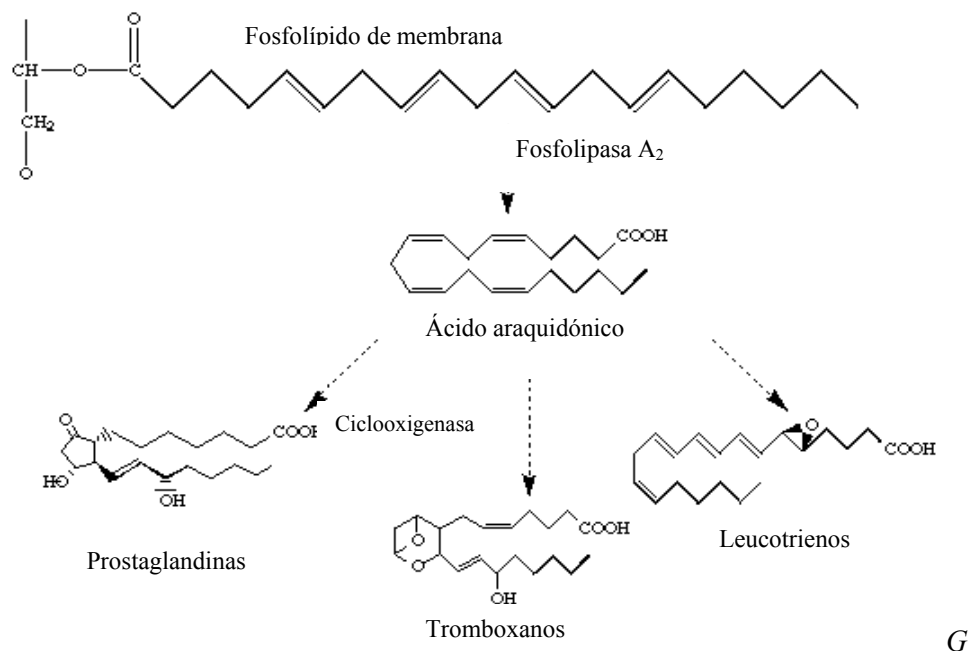


Figura N° 2: acción de la PLA₂ y los productos derivados de su acción.

4.3.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La preservación y almacenamiento de grasas y aceites intrigó al hombre desde la antigüedad. Las grasas y aceites cambian sus características de textura, color, sabor y olor; este proceso, conocido como ranciedad, fue químicamente definido en 1940 como una reacción en cadena autooxidativa por efecto de los radicales libres. Este proceso de oxidación por radicales libres de los ácidos grasos poliinsaturados es conocido en los sistemas biológicos como peroxidación lipídica⁽¹⁷⁾.

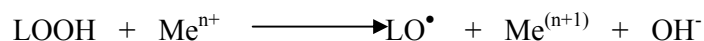
El proceso de peroxidación lipídica ocurre en tres pasos: iniciación, propagación y terminación.

La *iniciación* de la secuencia de peroxidación en una membrana o de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) resulta del ataque de alguna especie con suficiente reactividad para extraer un átomo de hidrógeno (H^\bullet) desde un grupo metileno, dejando un electrón no apareado en el carbono. La presencia de un doble enlace en la cadena del ácido graso insaturado debilita el enlace C-H del átomo de carbono adyacente al doble enlace y esto facilitaría la remoción del H^\bullet . Las especies que pueden abstraer el primer átomo de hidrógeno del PUFA incluye los radicales hidroxilo (OH^\bullet), alcoxil (RO^\bullet), peroxil (ROO^\bullet) y posiblemente el radical HO_2^\bullet , pero no el peróxido de hidrógeno H_2O_2 ni el superóxido ($O_2^{\bullet-}$)^(4,17).

El nuevo radical de carbono sufre un reordenamiento molecular formando un dieno conjugado que puede combinarse con una molécula de oxígeno para formar un radical peroxil, que es capaz de extraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso vecino dando inicio a la fase de *propagación* o de reacción en cadena⁽¹⁷⁾ (ver Figura N° 3).

En la fase de *terminación*, se produce la combinación de los productos iniciales de la peroxidación para dar lugar a compuestos más estables o a la producción de especies no reactivas mediante reacciones con los antioxidantes tipo Vit. E.

Los hidroperóxidos lipídicos son moléculas relativamente estables a temperatura fisiológica, pero su descomposición es catalizada por metales de transición y complejos metálicos dando origen a radicales alcoxil lipídicos (LO•).



La acumulación de grupos hidroperóxidos en carbonos alílicos lleva a su vez a la ruptura de la cadena carbonada y a la formación de compuestos citotóxicos tales como aldehídos (ver Figura N° 4), entre ellos el malondialdehído (MDA), considerado como uno de los principales indicadores de la peroxidación lipídica y el 4-hidroxinonenal (4-HNE)^(18,21).

La peroxidación lipídica de los ácidos grasos de membrana causa una menor fluidez de la misma, una disminución del potencial de membrana, un incremento de la permeabilidad hacia H⁺ y otros iones, y su eventual ruptura con liberación del contenido de las organelas celulares; lo que conlleva a la ruptura del equilibrio homeostático, pudiendo producir la muerte de la célula^(1,17,21).

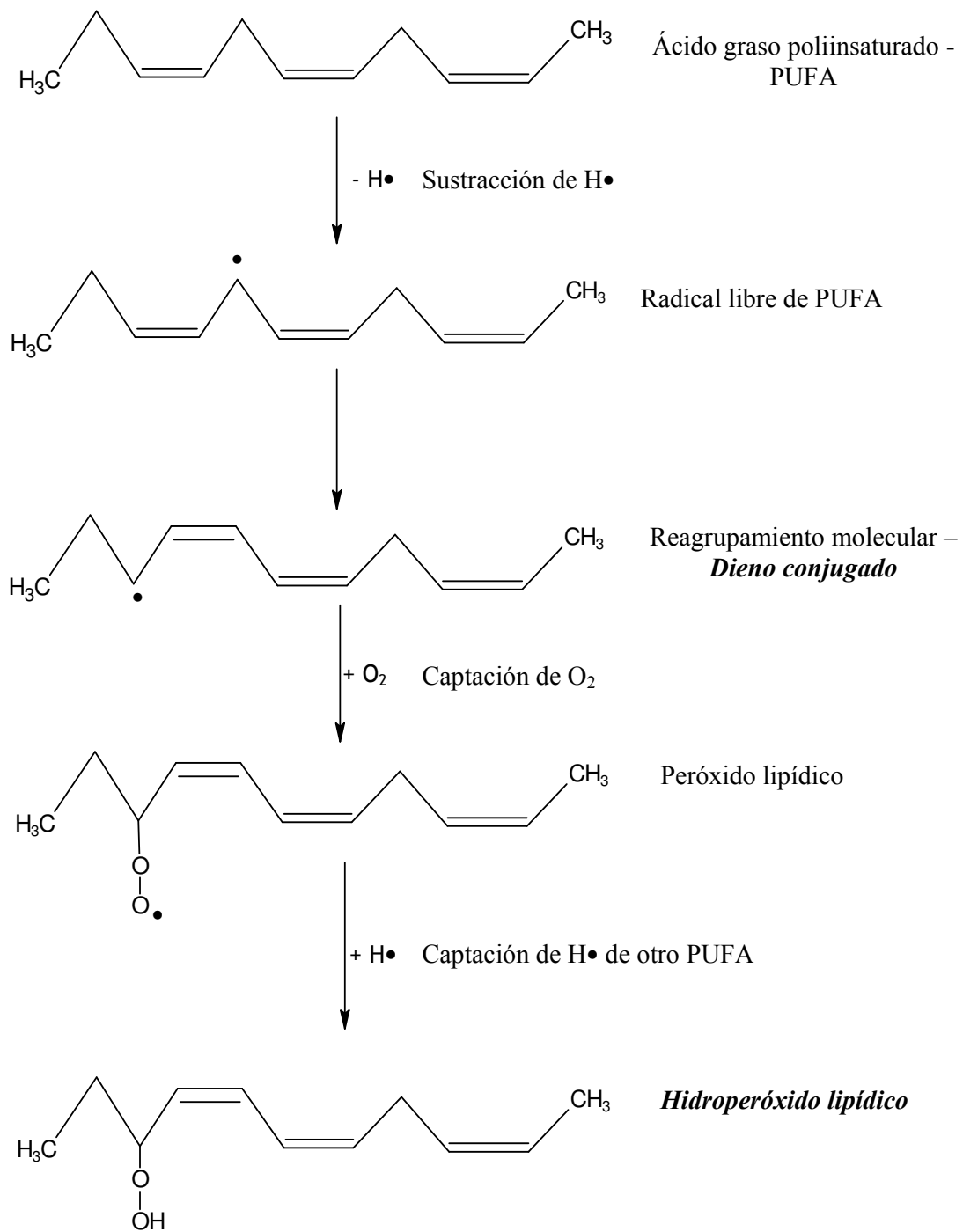


Figura N° 3: Proceso de Peroxidación lipídica

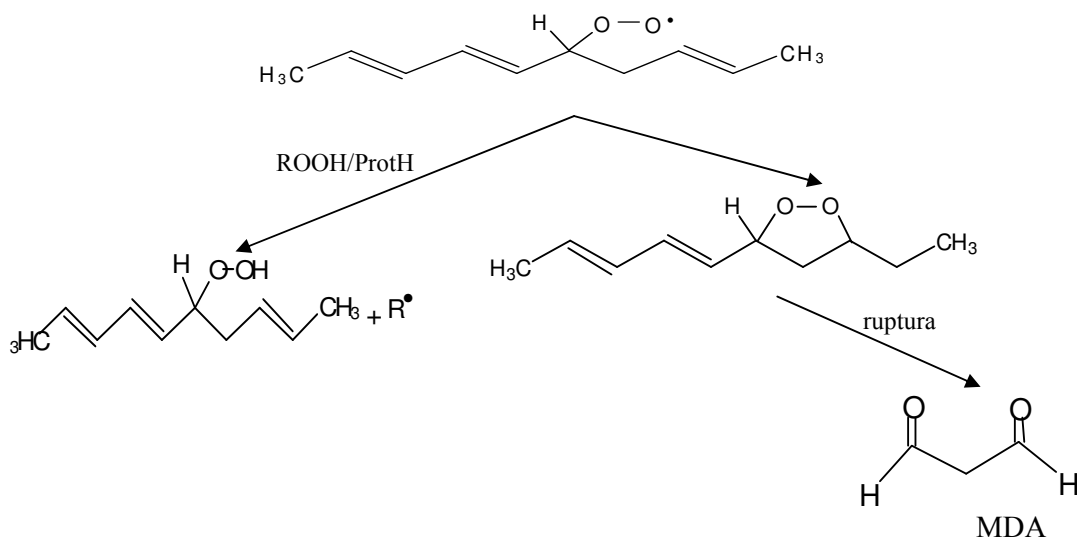


Figura N° 4 : Formación de MDA por ruptura del LOOH

4.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Los radicales libres cumplen una importante función en variados procesos homeostáticos, como intermediarios en reacciones redox esenciales para la vida, destrucción de microorganismos por fagocitosis, la síntesis de mediadores inflamatorios, en procesos detoxificadores, etc. Las concentraciones bajas de radicales libres son beneficiosas e incluso indispensables; sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicos, puesto que al oxidar moléculas biológicas las alteran, desencadenando trastornos en el metabolismo celular^(1,22).

Los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante protector que limita la acción nociva de los radicales libres. Este sistema protector se compone de enzimas y nutrientes esenciales cuya función es evitar la formación de los radicales libres, capturar aquellos que se han formado y remover o reparar las moléculas dañadas.

Los antioxidantes pueden definirse como moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o que inhiben sus reacciones con estructuras biológicas.

El mecanismo de efecto protector del antioxidante puede clasificarse por su modo, pudiendo ser preventivo o teniendo un rol en la ruptura de cadenas; por su sitio de acción, intracelular o extracelular; y según su mecanismo de acción, siendo

clasificados como enzimáticos o no enzimáticos. Esta última, es el tipo de clasificación más aceptada^(3,22).

4.4.1 Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres, posteriormente los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas.

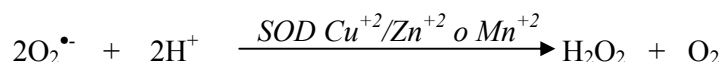
Una de las principales ventajas de los antioxidantes enzimáticos es que su actividad puede ser regulada acorde con los requerimientos celulares, pudiendo ser inducidas, inhibidas o activadas por efectores endógenos⁽²²⁾.

4.4.1.1 Superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1)

La Superóxido dismutasa es una metaloenzima presente en los organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados. Su biosíntesis se encuentra regulada por la concentración del sustrato sobre la cual actúa⁽³⁾.

La SOD presenta tres isoformas según el metal que utilice como cofactor; entre las isoformas predominantes están: CuZn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD. Entre ellas no existe homología de secuencias y estructuras de orden superior, lo que indica que evolucionaron independientemente como respuesta a una presión evolutiva común: la presencia del oxígeno y la amenaza de su toxicidad. La Fe-SOD se encuentra generalmente en procariotas, mientras que en las células eucariotas existen tres tipos de SOD, cuya localización es diferente: Mn-SOD es mitocondrial (ver Figura N° 5), CuZn-SOD a nivel citosólico y CuZn-SOD es extracelular⁽²³⁾.

La función fisiológica de la SOD es catalizar la reacción de dismutación del radical libre superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), antes de que reaccione con otras moléculas biológicas susceptibles, para esta reacción no es necesario la presencia de cosustratos. Así mismo, la enzima SOD es inhibida por H_2O_2 ^(1,23).



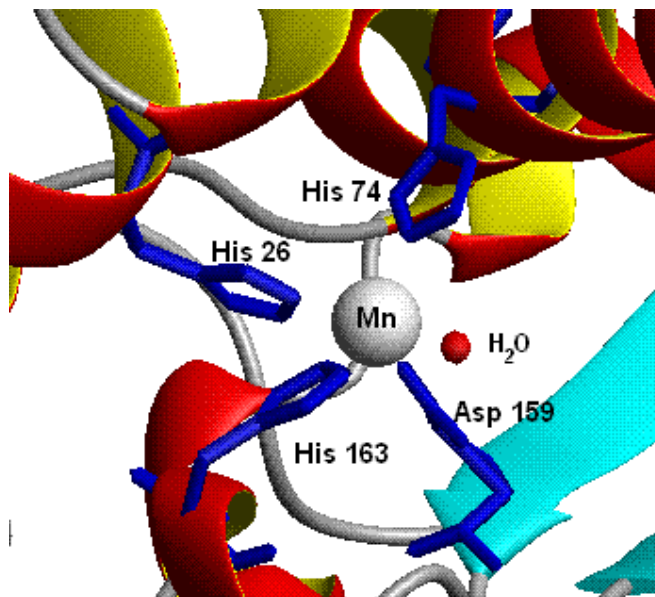
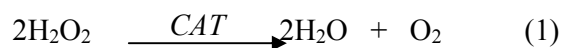


Figura N° 5: Estructura del centro activo de Mn^{+2} -SOD humana

4.4.1.2 Catalasa (EC. 1.11.1.6)

La CAT es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hem. Tiene amplia distribución intracelular, se concentra principalmente en peroxisomas y en las mitocondrias para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de la dismutación del superóxido, para formar agua y oxígeno molecular⁽³⁾.

La enzima CAT ejerce doble función, primero en la descomposición del H_2O_2 (reacción 1), y segundo en la oxidación de donadores de hidrógenos por ejemplo: metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles; denominado como actividad peroxidasa (reacción 2)⁽²⁴⁾.



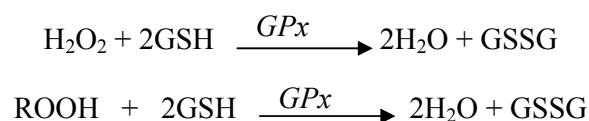
En general, las bajas concentraciones de H_2O_2 estimula la actividad de peroxidasa y las concentraciones elevadas de H_2O_2 serían preferentemente catalizadas por la catalasa.

4.4.1.3 Glutathion peroxidasa (EC. 1.11.1.9)

La GPx es el nombre general de una familia de enzimas con actividad peroxidasa, y fue descrita por primera vez por Gordon C. Mills en 1957.

La GPx es una glicoproteína tetramérica que tiene como cofactor al selenio y presenta 4 residuos de selenocisteína incorporados a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos. En las células animales se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol.

La función biológica de la GPx es la de reducir los hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes y la de reducir el H₂O₂ libre a agua, en presencia de glutatión (GSH) como agente reductor^(1,3,6).



Se han descrito 4 isoformas de GPx, que difieren tanto en su ubicación como en su especificidad hacia el sustrato. La primera de ellas, GPx celular que se encuentra prácticamente en todas las células y puede reducir tanto H₂O₂ como hidroperóxidos orgánicos libres. La segunda isoforma es la GPx plasmática o extracelular y es sintetizada en las células tubulares proximales del riñón. El tercer tipo es la GPx fosfolípido hidroperóxido, cuya función principal es proteger contra la peroxidación lipídica a nivel de membranas y de las lipoproteínas de baja densidad. El último tipo se denomina GPx gastrointestinal y resulta ser la peroxidasa de mayor dependencia por glutatión en el tracto gastrointestinal^(1,3).

4.4.2 Antioxidantes no enzimáticos

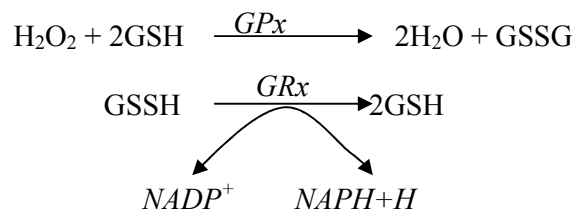
Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan un radical libre y originan especies químicas menos nocivas, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón al radical libre con la finalidad de estabilizarlo.

Los antioxidantes no enzimáticos hidrófilos se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial, matriz nuclear y en fluidos extracelulares; entre ellos están la vitamina C, glutatión, ácido úrico, flavonoides polifenólicos, etc; mientras que los del

tipo hidrofóbicos se encuentran asociadas a la membrana celular, entre ellos destacan la vitamina E.

4.4.2.1 Glutati6n

El GSH es un trip6ptido de 6cido glut6mico, ciste6na y glicina. Su capacidad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo ti6lico del resto de ciste6na. Puede actuar como antioxidante en reacciones enzim6ticas con la GPx o en reacciones no enzim6ticas. Protege de la oxidaci6n a grupos –SH esenciales de las prote6nas, pudiendo tambi6n actuar sobre enzimas inactivadas por oxidaci6n de sus grupos –SH. En presencia de GPx reduce el H₂O₂ a agua, dando lugar a su forma oxidada (GSSG) por la formaci6n de un puente disulfuro entre dos de estas mol6culas; gracias a la enzima glutati6n reductasa (GRx) es regenerado a su forma oxidada en presencia de NADP^{+(1,25)}.



Sus propiedades qu6micas le permite actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como per6xido de hidr6geno, super6xido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; adem6s, reduce el radical libre de tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original^(3,25).

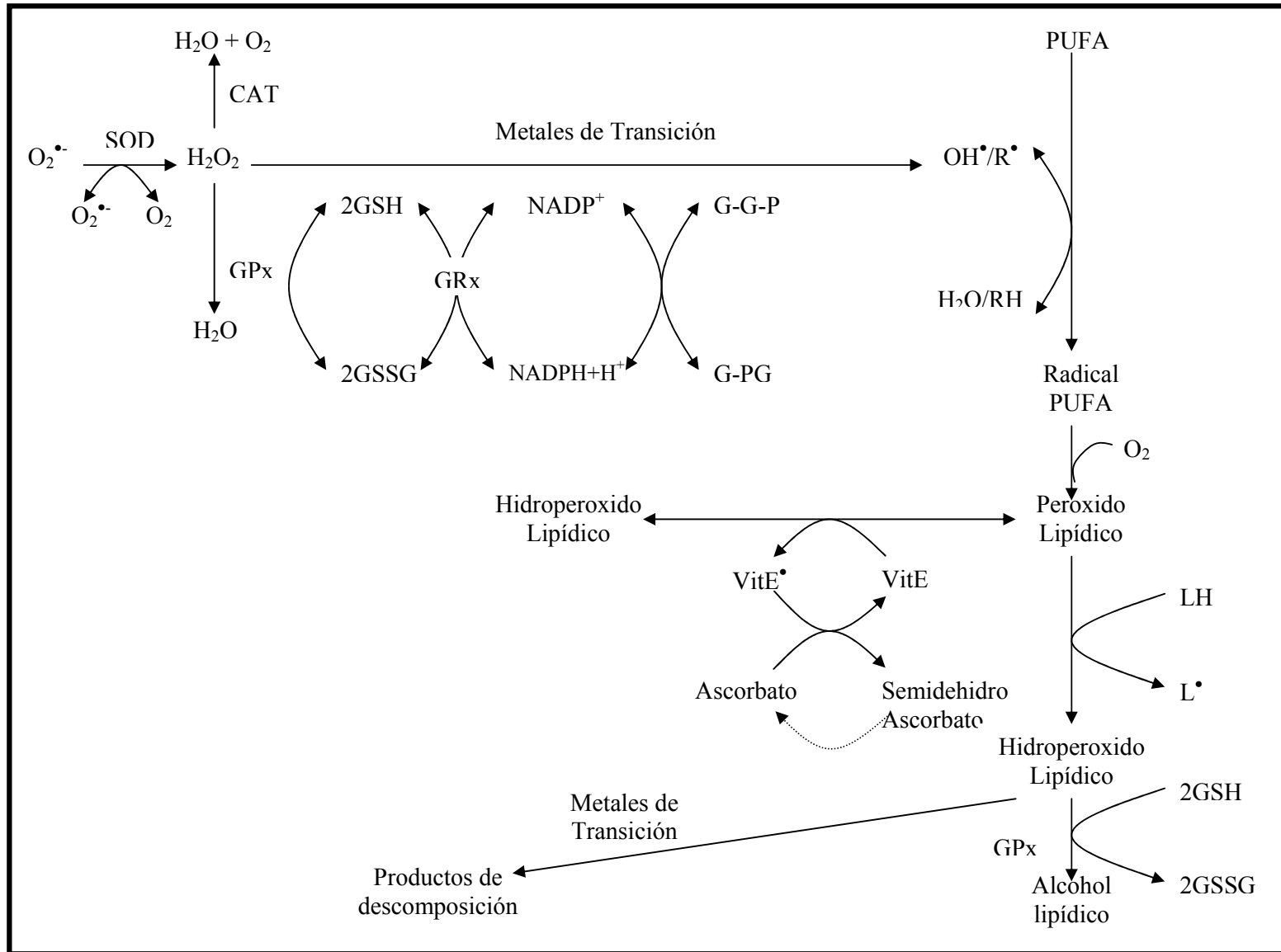
4.4.2.2 Vitamina E

Comprende varios compuestos de los cuales el alfa tocoferol es el m6s abundante y el delta tocoferol el oxidante m6s potente.

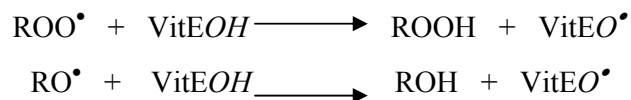
La VitE es de car6cter liposoluble y se considera el principal antioxidante de las membranas en las c6lulas animales. Su actividad suele atribuirse al car6cter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol⁽²⁵⁾.

Su solubilidad en la membrana le permite un acceso directo a los grupos ROO• que son reducidos a hidroper6xidos, los cuales ser6an degradados hasta alcoholes por la GPx, evitando la fase de propagaci6n de la peroxidaci6n lip6dica (ver Figura N° 6). As6

Figura N° 6 : Relación de los sistema antioxidante



la VitE es reducida a su forma de radical tocoferilo (VitEO[•]) que se regenerará gracias al ascorbato y al glutatión.⁽²⁵⁾

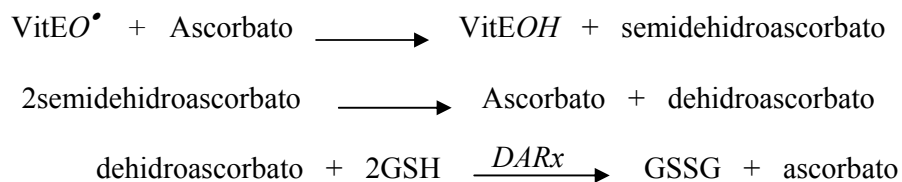


4.4.2.3 Vitamina C

La VitC o ácido ascórbico es una sustancia hidrosoluble, cuya principal fuente para el hombre son los alimentos. Su principal propiedad química es su capacidad para actuar como un potente agente reductor. Aunque su función fisiológica aún no está bien aclarada, se conoce que actúa como cofactor en 8 vías metabólicas diferentes.

La VitC puede existir en tres estados: ascorbato reducido, semidehidroascorbato y dehidroascorbato⁽²⁵⁾.

Además de regenerar el radical VitEO[•], la Vit-C es capaz de reaccionar con los radicales libres de oxígeno: superóxido, hidroperóxidos y el radical hidroxilo; para formar semidehidroascorbato, del cual se forma dehidroascorbato que es reducido nuevamente a ascorbato por la dehidroascorbato reductasa (DARx), reacción que requiere de glutatión reducido^(1,25).



4.5 ALTURA E HIPOXIA HIPOBÁRICA

La vida en las grandes alturas está influenciada por diferentes factores tales como: menor presión barométrica, hipoxia, frío, menor humedad, mayor exposición a radiaciones UV, etc. El principal de estos factores es la hipoxia, que se produce con el ascenso a grandes alturas a causa del descenso de la presión barométrica y de la consiguiente disminución de la presión parcial de oxígeno (pO_2) del aire ambiental; por ejemplo, la presión barométrica a nivel del mar es de 760 mmHg, a una altitud de 5800 m. la presión barométrica disminuye hasta 379 mmHg y a 8850 m. desciende hasta 253 mmHg. Así mismo, a medida que la presión barométrica disminuye con la altura, la pO_2 también decrece proporcionalmente llegando a niveles de 52.9 mmHg a 8850 m. en relación a 159 mmHg a nivel el mar. Este fenómeno promueve alteraciones en el contenido arterial de oxígeno y en consecuencia en la cantidad de oxígeno disponible en los tejidos^(9,26).

Con el ascenso rápido a la altura, la hipoxia se produce de forma aguda y el organismo no dispone de tiempo para adaptarse; provocando un descenso de la pO_2 inspirada que a su vez reduce la pO_2 arterial. Para minimizar los efectos de la pO_2 inspirada, la hipoxia de las grandes altitudes origina un aumento de la ventilación. La hiperventilación incrementa la excreción de dióxido de carbono, permitiendo el ascenso de la pO_2 a nivel alveolar y por consiguiente, el aumento de la pO_2 y del contenido de O_2 arterial. Además, la mayor excreción de dióxido de carbono origina un descenso de la concentración de iones hidrógeno de la sangre (H^+), que trae consigo el desarrollo de alcalosis, que inhibe la respuesta ventilatoria hipóxica. Así pues, el ascenso brusco a grandes altitudes provoca un incremento abrupto de la ventilación que está modulado por el desarrollo de alcalosis en la sangre^(9,27).

Con la permanencia durante varios días a gran altitud se producen nuevos cambios de la ventilación, conocidos habitualmente como aclimatación ventilatoria. La ventilación sigue aumentando a lo largo de varias semanas, a medida que el riñón compensa la alcalosis aguda mediante la excreción de iones bicarbonato, con el consiguiente aumento de las concentraciones de H^+ en la sangre⁽²⁷⁾.

Además del efecto sobre la ventilación se produce un aumento de la frecuencia cardíaca con el consiguiente aumento del gasto cardíaco, deshidratación y como consecuencia la disminución del volumen plasmático. En períodos de permanencia más largos se produce un aumento de los niveles de eritropoyetina, conllevando a un aumento de los niveles de hemoglobina y la capacidad del organismo de transportar más O_2 ⁽²⁷⁾.

Además de las alteraciones fisiológicas que se producen por el ascenso rápido a la altura, también se puede presentar ciertos síntomas como cefaleas, náuseas, vómitos, alteraciones gastrointestinales y del sueño; a nivel de la función cerebral se presenta una disminución de la capacidad motora, sensitiva y cognoscitiva, etc.; síntomas que en conjunto están designados como *Enfermedad de Montaña Aguda*. La continuidad de la exposición a la altura asociada al incremento de la severidad de los síntomas mencionados, podría inducir complicaciones más graves como edema pulmonar, edema cerebral o hasta la muerte^(9,26,28).

A nivel bioquímico, los estudios realizados sugieren que la hipoxia aguda produce la reducción de las corrientes iónicas a través de los canales de potasio (K^+) voltaje dependientes, situados en la membrana celular. Este evento conduce a la despolarización de las células, generando la apertura de los canales de calcio (Ca^{+2}) voltaje dependientes, permitiendo así el ingreso de este ión al interior de la célula⁽⁹⁾. La entrada masiva de Ca^{+2} a la mitocondria hace que se forme el poro de transición en la membrana mitocondrial interna, llevando a un colapso en el potencial electroquímico de protones, lo que provoca una disminución en los niveles de ATP que resulta nuevamente en una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más Ca^{+2} , creando un círculo vicioso que lleva a la pérdida de la función y a la muerte de la célula^(9,29).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Material Biológico

Se emplearon cobayos (*Cavia porcellus*) adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS). Todos los cobayos fueron machos adultos nacidos y criados a nivel del mar (Lima, 150 m) y alimentados *ad-libitum* hasta alcanzar un peso promedio de 500 g.

5.1.2 Diseño experimental

Los cobayos fueron divididos en cinco grupos de 10 cada uno, cuatro grupos fueron transportados al laboratorio de Biología Andina en Morococha (4540 m) y permanecieron en un cuarto atemperado a 25 °C hasta su sacrificio. Un grupo fue considerado como control a nivel del mar. Los tiempos de permanencia por grupo son especificados en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1: Diseño experimental

Grupo	Lugar	Tiempo (días)
A	Lima	Control
B	Morococha	1
C	Morococha	3
D	Morococha	7
E	Morococha	14

5.1.3. Tratamiento de la muestra

Para la recolección de la muestra, los cobayos fueron mantenidos en ayunas durante 24 horas antes del sacrificio. Los cobayos fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se procedió a retirar los cerebros por la parte occipital de cráneo, los mismos que fueron lavados con solución de cloruro de sodio 0,9 % a 4 °C e inmediatamente

colocados en bolsas de polietileno previamente identificadas. Para su conservación hasta el análisis, las muestras se congelaron en mezcla de hielo seco con metanol (-70 °C)⁽³¹⁾.

Las pruebas analíticas fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología Andina en Lima.

Para el análisis se tomó dos porciones similares de cada cerebro, para luego ser homogeneizado en sus respectivas soluciones buffers a 4 °C por un tiempo no mayor a los 5 min. Los respectivos homogeneizados y sobrenadantes fueron usados para realizar las diferentes determinaciones según se muestra en el Figura N° 7.

5.2 Mediciones

5.2.1 Determinación de cuerpos carbonílicos (CC)

La oxidación de proteínas fue determinada mediante el contenido de CC según el método descrito por Levine y col⁽³²⁾.

Este método está basado en la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona de la reacción entre los grupos carbonilos de las proteínas oxidadas y el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) en medio ácido, el producto final es soluble en solución saturada de guanidina y es leído por espectrofotometría a 270 nm.

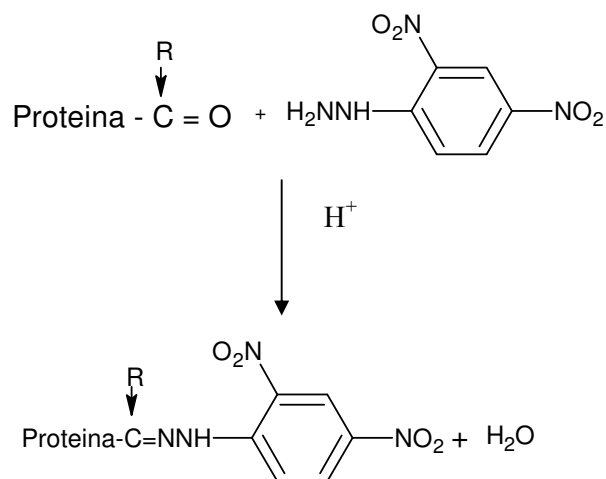
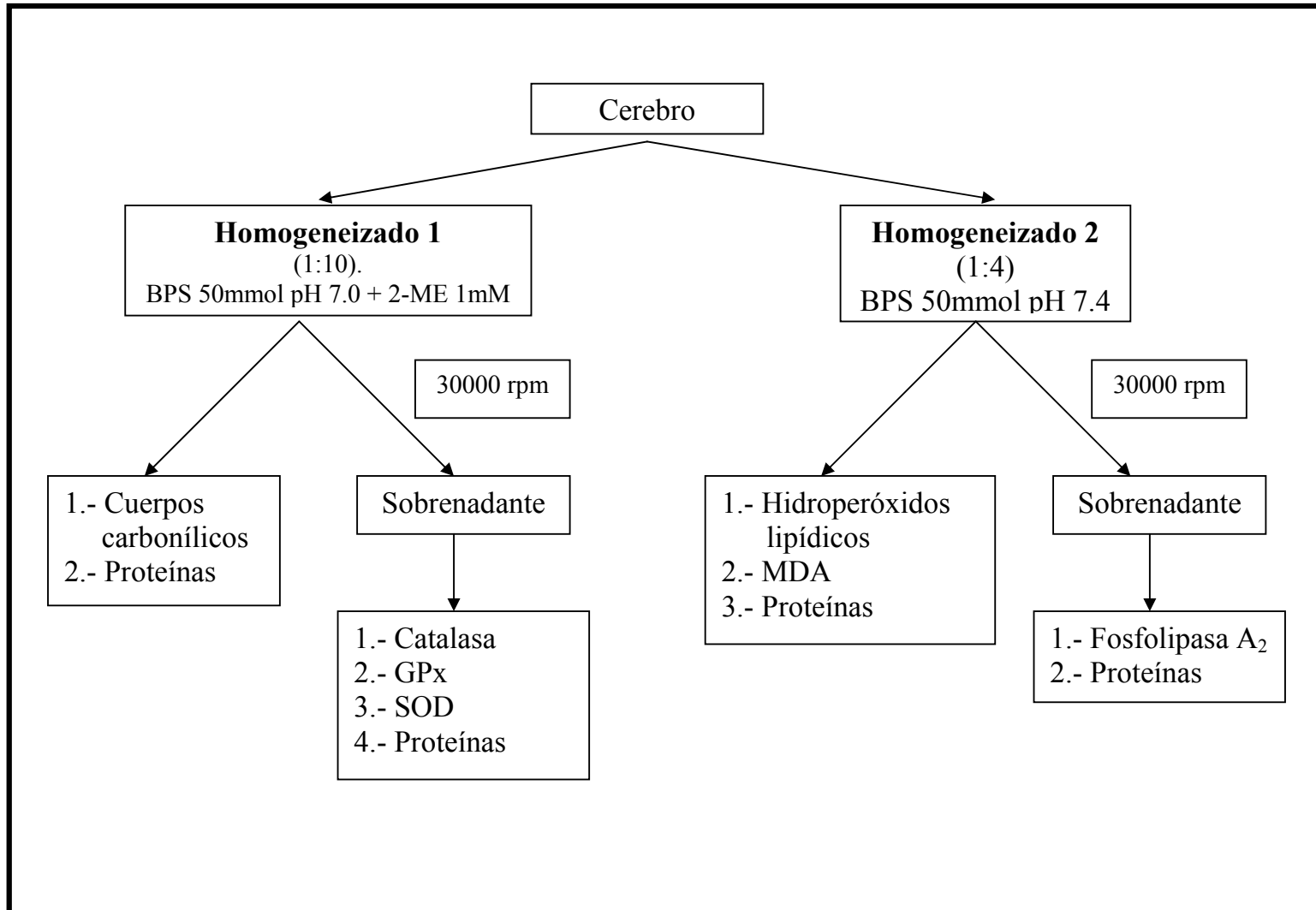


Figura N° 7: Esquema metodológico



Para la determinación de los CC se tomó 200 μL del homogeneizado 1 y se le adicionó 200 μL de ácido tricloroacético (ATC) al 20 % a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, se centrifugó a 10000 rpm y al precipitado se le añadió 200 μL de 2,4-DNPH 10 mM en HCl 2 M, se incubó por 30 min con agitación cada 5 min, al blanco se le añadió igual volumen de HCl 2 M, ambas se trabajaron en paralelo. Después, se procedió a añadir 200 μL de ATC 50 % e inmediatamente se centrifugó en refrigeración a 4000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con 500 μL de Etanol:Acetato de etilo (1:1). Finalmente el pellet se resuspendió en solución de guanidina 6 M y fue leído por espectrofotometría a 270 nm.

Para los cálculos, se trabajó con la diferencia de absorbancia entre la muestra y su respectivo blanco (ΔAbs), usando el coeficiente de extinción ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para la 2,4-dinitrofenilhidrazina a 270 nm y el contenido de proteínas medidos por el método espectrofotométrico UV.

Fórmula:

$$nmolCC / mgProt = \frac{\Delta Abs}{mgProt / mL} \times 113.6864$$

5.2.2 Determinación de Fosfolipasa A₂ (FLA₂)

La actividad de Fosfolipasa A₂ fue determinada mediante el método espectrofotométrico descrito por De Oliveira & Palma⁽³³⁾.

Este método se fundamenta en el cambio de pH debido a la liberación de ácidos grasos por la acción de la Fosfolipasa A₂ sobre la fosfatidilcolina; el cambio de pH se evidencia por el cambio de absorbancia a 558 nm del indicador rojo de fenol.

Para la determinación de la actividad de Fosfolipasa A₂ se adicionó 50 μL del sobrenadante del homogeneizado 2 en 1 mL de la mezcla reactiva conteniendo fosfatidilcolina 6 μmol disuelto en Triton X-100 7.2 μmol , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 μmol , rojo de fenol 32 nmol y TRIS 3 μM a pH 7.9. La mezcla fue incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ y la reacción fue seguida durante 5 min, midiéndose el decrecimiento de absorbancia a 558 nm en cada minuto. Para el blanco se midió la absorbancia de la mezcla reactiva sin la adición de la muestra.

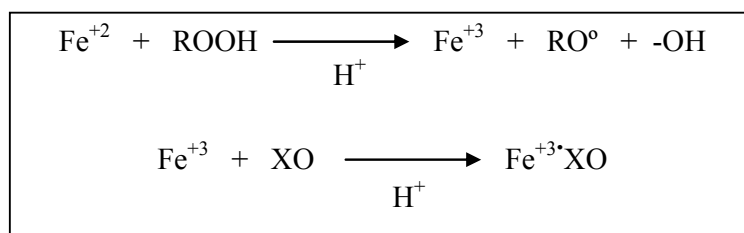
Para la determinación de proteínas, se tomó 10 μL del sobrenadante del homogeneizado 2, se mezcló con 2 mL de reactivo de Bradford y se leyó a 595 nm .

La actividad de FLA₂ fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de fosfatidilcolina por mg de proteína y fue expresada como actividad específica (U/gProt).

5.2.3 Determinación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

La determinación de LOOH se realizó por espectrofotometría según el método descrito por J. Nourooz – Zadeh y col⁽³⁴⁾.

Este método se fundamenta en la oxidación de iones ferrosos a férricos por los hidroperóxidos lipídicos en condiciones ácidas, los iones férricos formados se unen al indicador xilenol naranja para formar un complejo coloreado estable que es leído por espectrofotometría a 560 nm .



Para su determinación se tomó 200 μL del homogeneizado 2 dividido en dos tubos (100 μL c/u): al primero se le adicionó sólo 10 μL de Trifenilfosfina 10 mM (reductor específico de los LOOH, usado para la diferenciación de los hidroperóxidos lipídicos de otros peróxidos) y al segundo 10 μL de metanol. Para el blanco se tomó 100 μL de BPS 50 mmol pH 7.0 y volúmenes iguales de TPP y metanol descrito anteriormente. Se incubó a temperatura ambiente por 30 min, luego se añadió 1000 μL de Reactivo FOX2 que contiene sulfato de amonio ferroso 25 mM, xilenol naranja 100 mM, H_2SO_4 25 mM y BHT 4 mM en 90 % de metanol; se incubó a temperatura ambiente por 30 min, inmediatamente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue leído por espectrofotometría a 560 nm .

Para los cálculos, se tomó el valor de la diferencia de absorbancia de la muestra con TPP y la muestra sin TPP (ΔAbs), ambos valores ya restados del blanco y se usó el coeficiente de extinción de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Fórmula:

$$\text{umolLOOH} / \text{gProt} = \frac{\Delta Abs}{\text{mgProt} / \text{mL}} \times 258.1395$$

5.2.4 Determinación de malondialdehído (MDA)

El contenido de MDA fue determinado como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) mediante el método espectrofotométrico descrito por Hong Yu⁽³⁵⁾ en el que se determina el MDA libre y el unido a proteínas por adición de NaOH concentrado.

Para la determinación de MDA se tomó 500 μL del homogeneizado 2 al que se adicionó 50 μL de Butirilhidroxitolueno 0.2 % y 20 μL de NaOH 12.5 N, se incubó en baño de agua a 60 °C por 30 min. Inmediatamente se adicionó 1500 μL de ATC 10 % a 4 °C por 10 min y luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Se tomó 1000 μL del sobrenadante y se le añadió 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.6 % y se incubó a 95 °C por 45 min. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Para el blanco, se realizó el mismo procedimiento con BPS 50 nmol pH 7.4 en vez de muestra. El sobrenadante fue leído por espectrofotometría a 532 nm.

Para los cálculos se tomó el valor de la diferencia de absorbancia de la muestra y el blanco (ΔAbs) y el valor del coeficiente de extinción ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) del MDA a 532 nm.

Fórmula:

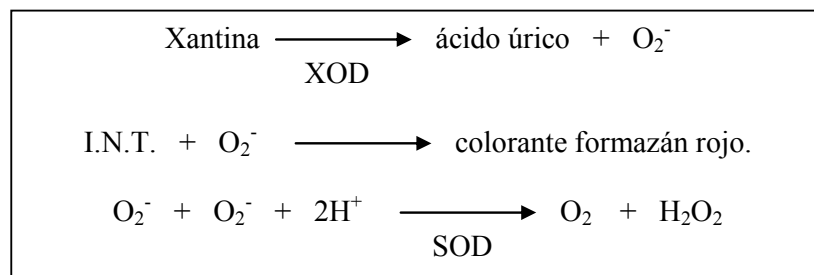
$$\text{umolMDA} / \text{mgProt} = \frac{\Delta Abs}{\text{mgProt} / \text{mL}} \times 38.4615$$

5.2.5 Determinación de Superóxido dismutasa (SOD)

Para la determinación de la actividad de la enzima SOD se utilizó el Kit RANSOD de la casa comercial RANDOX, basado en el método de Mc Cord y Fridovich⁽³⁶⁾.

Este método se fundamenta en el grado de inhibición de la formación del colorante formazán rojo a partir de la reacción del reactivo cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) con los radicales superóxido formados en la oxidación de xantina catalizada por xantina oxidasa (XOD).

Para la determinación de la actividad de SOD, se tomó 25 μL del sobrenadante del homogeneizado 1 diluido al 50 % y se mezcló con 850 μL del sustrato RANSOD, a esta mezcla se le adicionó 100 μL de la solución de xantina oxidasa y se midió el cambio de absorbancia a 505 nm cada 30 s durante 3 min. Se siguió el mismo procedimiento para el blanco y el estándar usando 25 μL del diluyente RANSOD y 25 μL de solución estándar en lugar de muestra respectivamente.



Para los cálculos, el cambio de absorbancia por minuto ($\Delta Abs/\text{min}$) del blanco fue considera como un 100 % de actividad.

Fórmula:

$\%INH = 100 - \frac{\Delta AbsMuestra / \text{min} \times 100}{\Delta AbsBlanco / \text{min}}$

Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria que puede causar el 50 % de inhibición de la formación del colorante a temperatura ambiente. El porcentaje de inhibición de la muestra fue relacionada con la del estándar, para determinar las actividad de SOD en U/L.

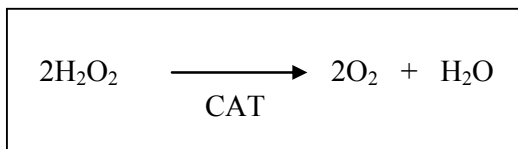
Para la determinación de proteínas, se tomó 50 μL de la dilución sobrenadante del homogeneizado 1, se mezcló con 1 mL del reactivo de Bradford y se leyó a 595 nm .

La actividad de SOD fue expresada como actividad específica (U/mgProt).

5.2.6 Determinación de Catalasa (CAT)

La actividad de la enzima Catalasa se determinó según el método de Aebi⁽²⁴⁾.

Este método se fundamenta en la descomposición del H_2O_2 catalizada por la enzima catalasa medida por espectrofotometría UV a 240 nm .



Para la determinación de la actividad de la enzima CAT se mezcló 2.9 mL de H_2O_2 0.05 % en BPS 50 mM a pH 7.0 y 0.1 mL de sobrenadante del homogeneizado 1. La descomposición de H_2O_2 fue medido directamente por decrecimiento de la absorbancia a 240 nm cada 15 s durante 2 min. Para el blanco se utilizó BPS 50 mM a pH 7.0 en lugar de muestra.

Para los cálculos, se tomó el valor de la diferencia de absorbancia por minuto de la muestra con el blanco ($\Delta Abs / \text{min}$) y el coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 a 240 nm ($4.0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La actividad de CAT fue expresada como actividad específica (U/mgProt)

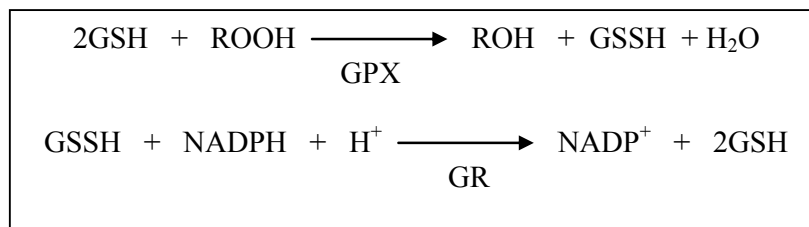
Fórmula:

$$U / \text{mgProt} = \frac{\Delta Abs / \text{min}}{\text{mgProt} / \text{mL}} \times 7500$$

5.2.7 Determinación de Glutation peroxidasa (GPx)

Se utilizó el Kit comercial RANSEL de la casa comercial RANDOX, basado en el método de Plagia y Valentine.⁽²⁷⁾

Este método se fundamenta en la oxidación de glutatión (GSH) por el hidróxido de cumeno catalizado por la glutatión peroxidasa (GPx), en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH, el glutatión oxidado (GSSG) es inmediatamente convertido a su forma reducida con la concomitante oxidación NADPH a NADP^+ , midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm por la desaparición de NADPH.



Para la determinación de la actividad de GPx se utilizó 20 μL de sobrenadante del homogeneizado 1, se adicionó 500 μL del reactivo Ransel que contiene glutatión, Glutathion reductasa y NADPH; luego se añadió 20 μL del hidróxido de cumeno. Se siguió el mismo procedimiento para el blanco usando BPS 50 mmol a pH 7.0 en lugar de muestra. Se mezcló bien y se siguió las lecturas de absorbancia a 340 ηm al primer, segundo y tercer minuto para el blanco y las muestras.

Para la determinación de proteínas, se tomó 10 μL del sobrenadante del homogeneizado 1, se mezcló con 1 mL del reactivo de Bradford y se leyó a 595 ηm .

Para los cálculos, se tomó el valor de la diferencia de absorbancia por minuto de la muestra con el blanco ($\Delta Abs/\text{min}$) y el coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 ηm ($6.22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La actividad de GPx fue expresada como actividad específica (U/gProt)

Fórmula:

$$U / gProt = \frac{\Delta Abs / \text{min}}{mgProt / ml} \times 4340.836$$

5.2.8 Determinación de Proteínas

Método de Bradford

Para la determinación de proteínas se usó el método de Bradford, que se fundamenta en la formación de un complejo entre el reactivo azul de coomasie y las proteínas en solución, causando un cambio en el máximo de absorción a 595 ηm .

Para su preparación se disolvió 100 mg del reactivo azul de coomasie en 50 mL de etanol al 95 % y se añadió 100 mL de ácido ortofosfórico al 85 % y se completó con agua bidestilada c.s.p. 1 L. Se dejó en reposo por 24 h en un frasco ámbar y se filtró con papel filtro.

Para la realización de la curva estándar se utilizó como patrón soluciones de albúmina bovina a diferentes concentraciones: 2, 5, 10, 12.5, 20 y 25 $\mu\text{g/mL}$; se tomó 10 μL de cada una y se mezclaron con 1 mL del reactivo de Bradford, se dejó en reposo por 2 min y se leyó por espectrofotometría a 595 ηm .

Espectrofotometría UV

El contenido de proteínas en la muestra fue determinado tomando una alícuota de 10 µL de la solución final de guanidina en 500 µL de NaOH 0.2 N y leído por espectrofotometría a 280 nm (correspondiente a los aminoácidos tirosina y triptófano) y a 260 nm (correspondiente a ADN). El estándar se realizó con una solución de albúmina 0.1 % en guanidina 6 M siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente fórmula:

$$mgProt / mL = (1.55 \times Abs_{280nm}) - (0.76 \times Abs_{260nm})$$

5.2.9 Análisis estadístico

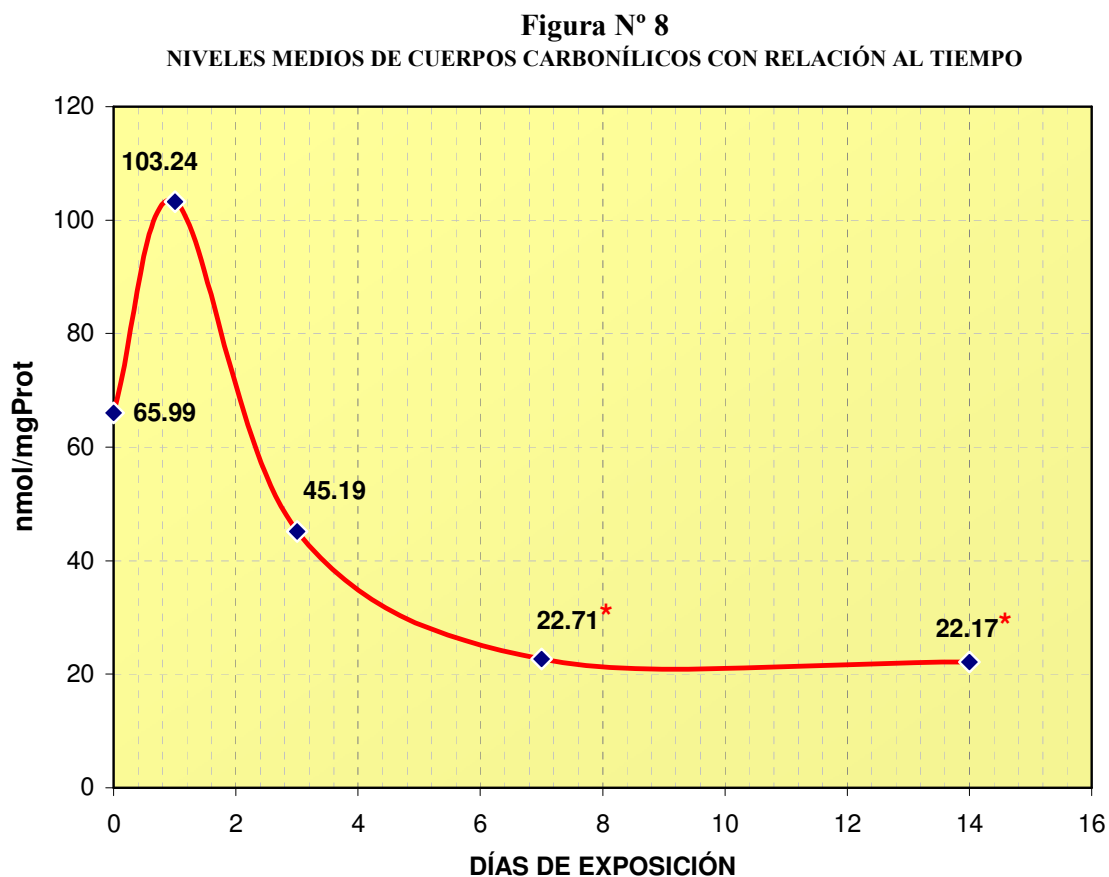
Para el análisis de datos se utilizó el programa estadístico SPSS 11.5. Los resultados obtenidos de los grupos de estudios y de control se expresan como medias y desviaciones estándar (SD). Se aplicó la prueba ANOVA, para los resultados con varianzas homogéneas se aplicó la prueba de Turkey y para varianzas heterogéneas la prueba de Tamhane. Todo resultado cuyo valor asociado de p sea menor que 0.05 se considera estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los grupos estudiados los días 1, 3, 7 y 14 de su arribo a Morococha (4540 m) fueron analizados comparando sus promedios y desviaciones estándar con los del grupo control a nivel del mar y entre ellos mismos. Dichos valores son mostrados en la Tabla N° 2.

6.1 Determinación de cuerpos carbonílicos (CC)

La concentración de CC al primer día de exposición aumentó sin diferencia significativa con relación al grupo control. A partir del tercer día hay una disminución de las concentraciones de CC por debajo de los niveles del control, sólo los grupos del 7mo y 14to día presentaron diferencia significativa en relación al control ($p < 0,05$), como se muestra en la figura N° 8. No existe diferencia significativa entre los grupos expuestos a la altura.



* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

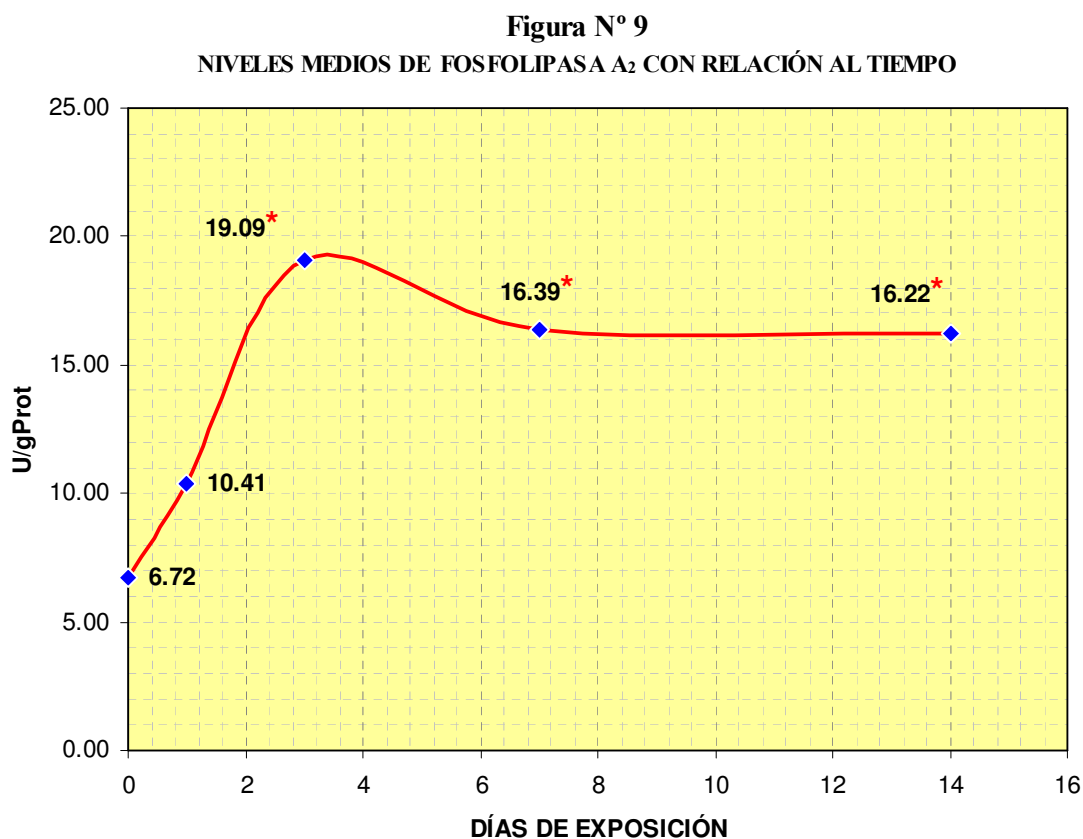
Tabla N° 2

Valores medios de los marcadores de oxidación y de las enzimas antioxidantes.

Parámetro	Días	Media \pm SD	VALORES	
			máx	mín
CC (η mol/mgProt)	Control	65.99 \pm 28.80	111.0	41.6
	1	103.24 \pm 67.00	233.0	33.8
	3	45.19 \pm 34.70	124.0	14.1
	7	22.71 \pm 14.40	56.6	10.4
	14	22.17 \pm 11.80	36.3	3.4
FLA ₂ (U/gProt)	Control	6.72 \pm 2.41	11.6	4.0
	1	10.41 \pm 8,22	27.0	2.4
	3	19.09 \pm 13.83	42.6	4.7
	7	16.39 \pm 6.73	24.8	6.1
	14	16.22 \pm 7.51	26.5	2.0
LOOH (μ mol/gProt)	Control	123 \pm 74	271	51
	1	334 \pm 106	506	227
	3	265 \pm 231	782	62
	7	248 \pm 168	553	6
	14	227 \pm 182	553	33
MDA (μ mol/mgProt)	Control	4.71 \pm 1.41	6.45	2.43
	1	15.39 \pm 1.44	17.40	13.60
	3	14.84 \pm 1.25	16.90	12.60
	7	14.10 \pm 1.42	15.90	12.10
	14	13.42 \pm 1.90	16.20	10.80
SOD (U/mgProt)	Control	0.23 \pm 0.08	0.37	0.13
	1	0.59 \pm 0.24	1.03	0.22
	3	0.62 \pm 0.44	1.53	0.14
	7	0.36 \pm 0.18	0.62	0.14
	14	0.42 \pm 0.41	1.47	0.14
CAT (U/mgProt)	Control	85.00 \pm 16.50	110.00	63.80
	1	130.35 \pm 26.30	176.00	88.50
	3	112.05 \pm 24.40	167.00	86.10
	7	120.22 \pm 19.60	151.00	94.00
	14	143.09 \pm 41.60	195.00	72.80
GPx (U/gProt)	Control	27.63 \pm 9.60	42.20	14.00
	1	56.27 \pm 30.40	110.00	17.50
	3	50.06 \pm 21.60	76.40	24.30
	7	83.06 \pm 8.10	93.50	70.40
	14	136.45 \pm 33.5	195.00	95.00

6.2 Determinación de Fosfolipasa A₂ (FLA₂)

La actividad enzimática de FLA₂ aumenta hasta el tercer día de exposición a la altura manteniéndose al cabo del día 7 y 14. Existe diferencia significativa de los grupos de 3, 7 y 14 días de exposición a la altura con relación al grupo control ($p < 0,05$), pero no entre ellos mismos, tal como se muestra en la figura N° 9.

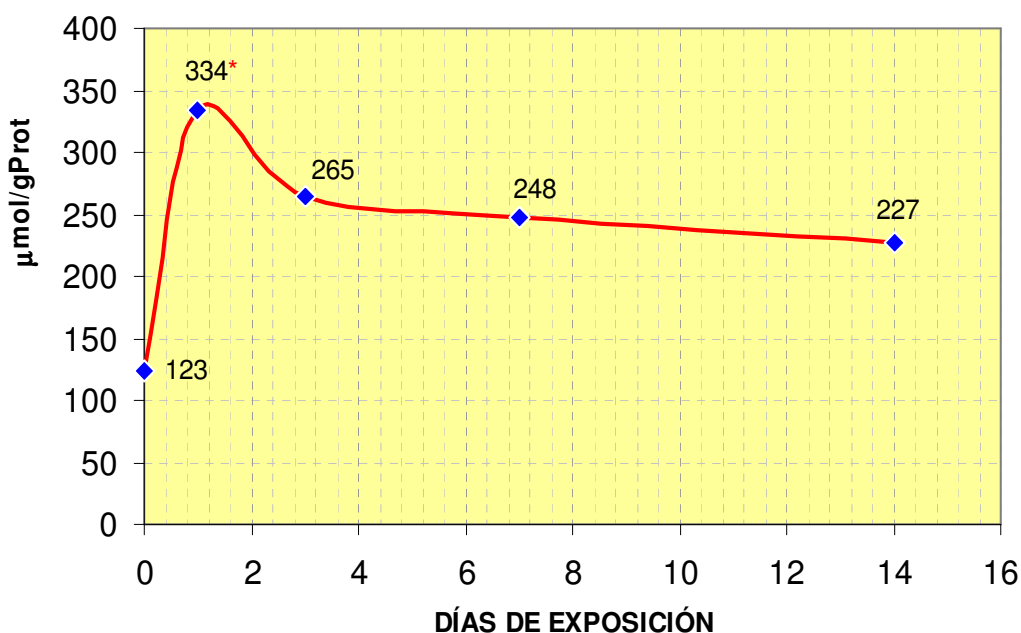


* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

6.3 Determinación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Los niveles de LOOH aumentan significativamente el primer día de exposición a la altura ($p < 0,05$), disminuyen desde el 3er día, pero sin presentar diferencia significativa con relación al control ni entre éstos, como se muestra en la figura N° 10.

Figura N° 10
NIVELES MEDIOS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS CON RELACIÓN AL TIEMPO



* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

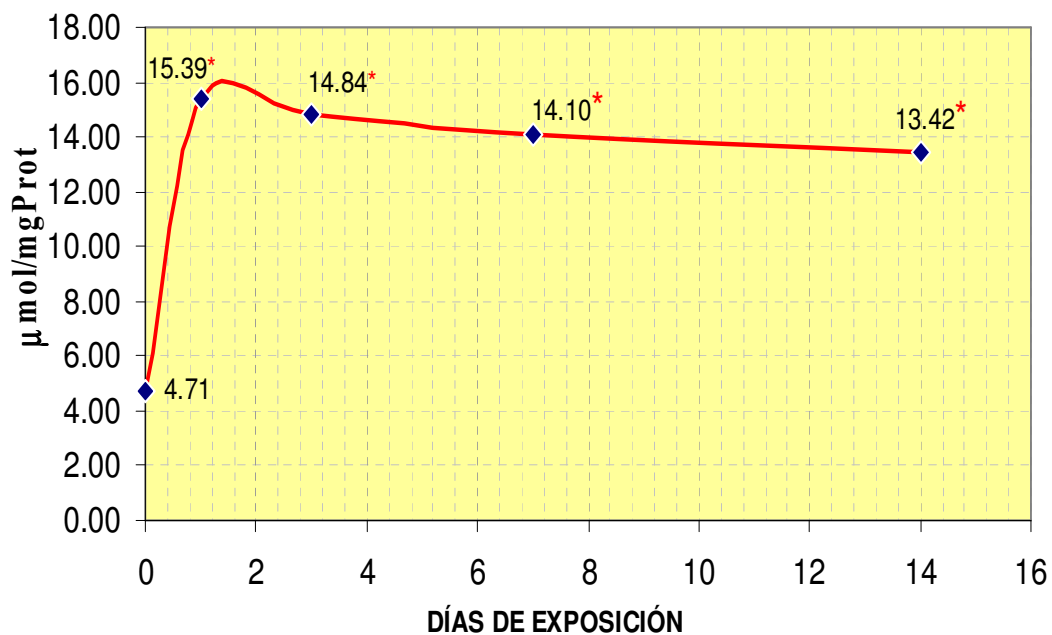
6.4 Determinación de malondialdehído (MDA)

La figura N° 11 muestra un aumento de los niveles de MDA a partir del primer día de exposición, que se mantiene hasta el día 14, presentando todos los grupos diferencia significativa con respecto al control ($p < 0,05$), no presentando diferencia significativa entre ellos.

6.5 Determinación de Superóxido dismutasa (SOD)

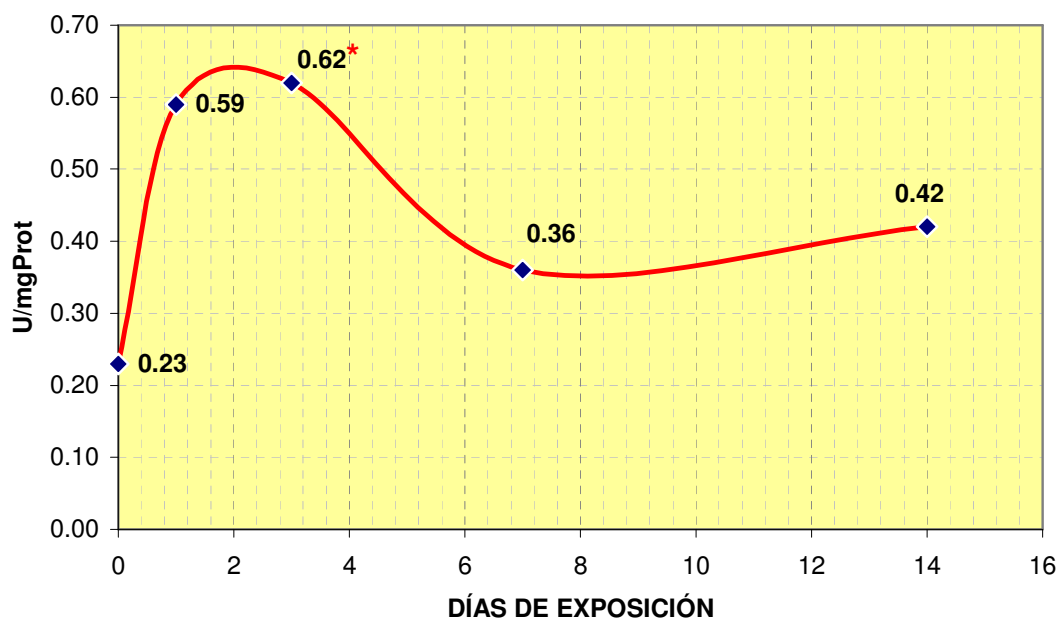
Se evidencia un incremento de la actividad enzimática de SOD al primer y tercer día de exposición; sin embargo, al 7mo día dichos valores disminuyen al nivel del grupo control manteniendo la tendencia hasta el día 14, tal como se muestra en la figura N° 12. Sólo hay diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo del 3er día con relación al grupo control. No existe diferencia significativa de las actividades de SOD entre los grupos expuestos a la altura.

Figura N° 11
NIVELES MEDIOS DE MALONDIALDEHÍDO CON RELACIÓN AL TIEMPO



* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

Figura N° 12
NIVELES MEDIOS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA CON RELACIÓN AL TIEMPO

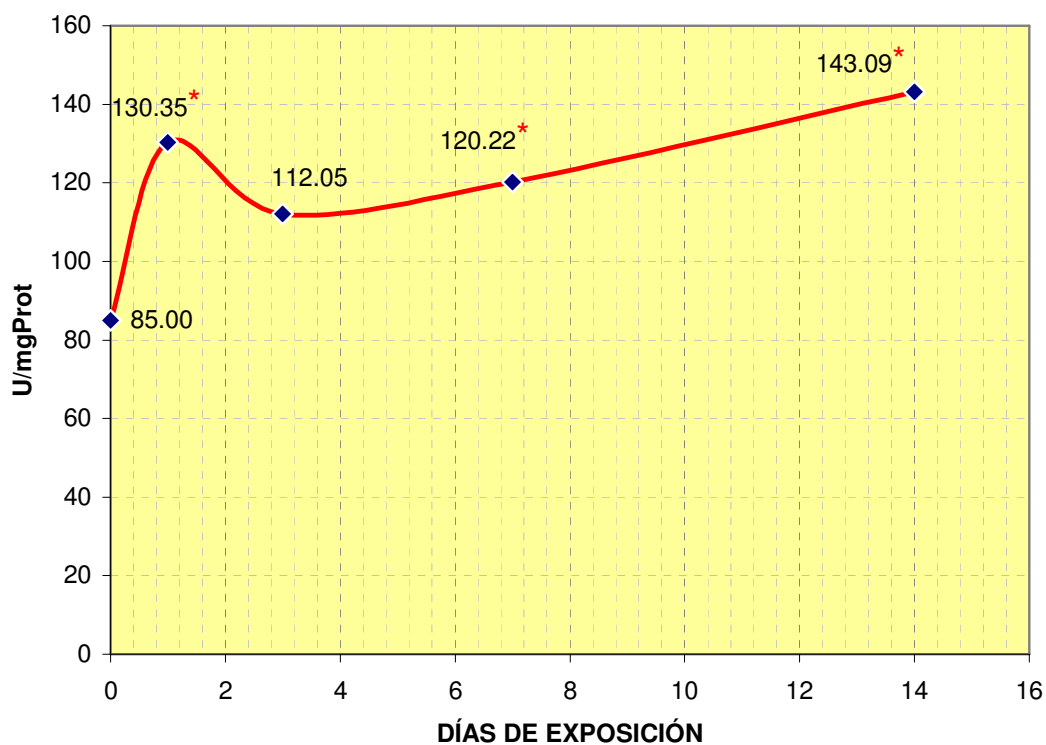


* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

6.6 Determinación de Catalasa (CAT)

La figura N° 13 muestra un aumento de la actividad de la enzima CAT en los diferentes tiempos de estudio, siendo los grupos de los días 1, 7 y 14 estadísticamente diferentes respecto al control ($p < 0,05$); sin embargo, no existe diferencia significativa entre las actividades enzimáticas de los grupos expuestos a altura.

Figura N° 13
NIVELES MEDIOS DE CATALASA CON RELACIÓN AL TIEMPO

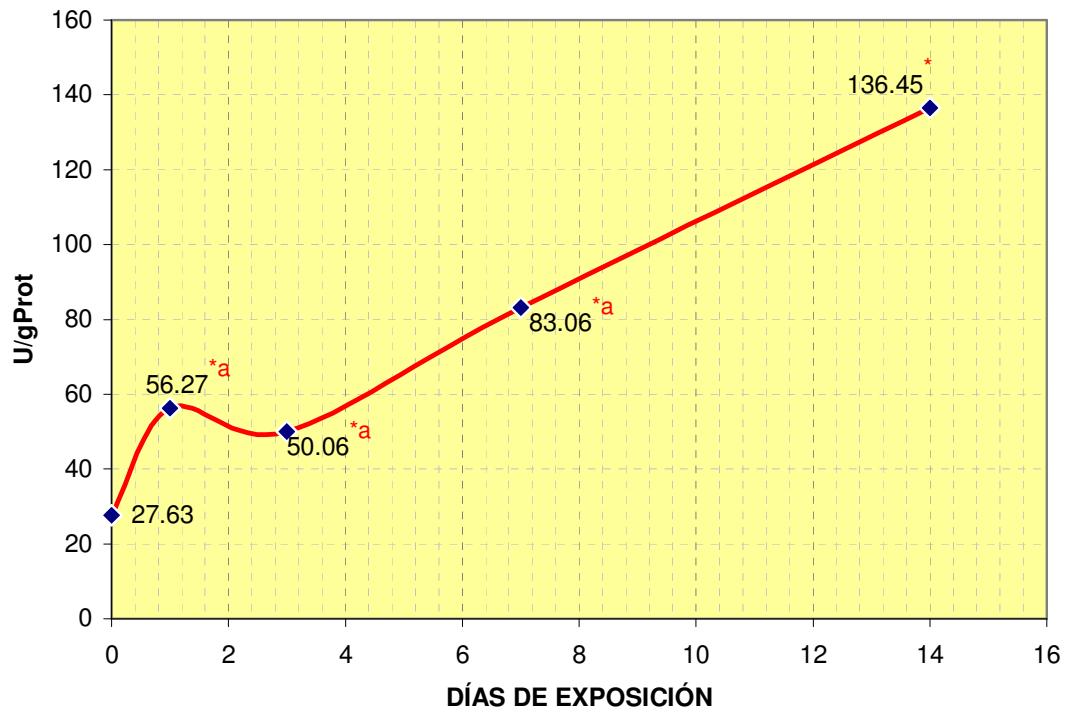


* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control.

6.7 Determinación de Glutation peroxidasa (GPx)

La enzima GPx muestra un incremento exponencial de su actividad en relación al tiempo, existiendo diferencia significativa entre los grupos de los días 7 y 14 con respecto al grupo control ($p < 0,05$), y también entre los grupos de los días 1, 3 y 7 con relación al grupo del día 14 de exposición ($p < 0,05$), tal como se muestra en la figura N° 14.

Figura N° 14
NIVELES MEDIOS DE GLUTATION PEROXIDASA CON RELACIÓN AL TIEMPO



* con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al blanco.

^a con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo de 14 días

VII. DISCUSIÓN

La exposición aguda a la altura está relacionada con un aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROs), lo cual es explicado por diferentes mecanismos, entre ellos los relacionados directamente al aumento del Ca^{+2} intracelular y al mayor consumo de ATP. En condiciones normales el ATP es metabolizado hasta xantina para ser convertido a ácido úrico por acción de la xantina deshidrogenasa; sin embargo, altas concentraciones de Ca^{+2} intracelular estimulan la conversión de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, que metaboliza la misma reacción pero con la liberación de un radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). También, Oyola y col han reportado un aumento de los niveles de catecolaminas en sangre, lo que conlleva a un aumento de la producción de EROs generadas en su proceso de autooxidación⁽¹¹⁾. Otros factores potenciales que contribuirían al aumento de EROs por exposición a la altura son: aumento de la luz ultravioleta, disminución de la temperatura, etc^(9,10).

En un estudio realizado por Jefferson y col, concluyen que la exposición aguda a las grandes alturas de Cerro de Pasco (4300 m) produce un aumento de EROs, que ejerce un efecto deletéreo sobre las proteínas y los lípidos, lo que conllevaría al estrés oxidativo⁽¹²⁾. Así mismo, numerosos estudios demuestran un incremento de la producción de indicadores de estrés oxidativo en músculo, sangre, orina y en diferentes tejidos en respuesta a la hipoxia^(11,13,14). Existen escasos estudios relacionados al metabolismo oxidativo en el tejido cerebral en la exposición a las grandes alturas usando modelos animales y aún menos que hayan realizado un seguimiento continuo del sistema antioxidante y de los marcadores de estrés oxidativo.

Frente al incremento de la producción de EROs, la primera línea de defensa son las enzimas antioxidantes constituidas por la Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutacion peroxidasa (GPx); que actúan reduciendo la velocidad de iniciación de la cadena oxidativa^(1,4,16,38).

En el presente estudio se encontró que, los niveles de las enzimas mencionadas del tejido cerebral de cobayos nacidos y criados al nivel del mar se incrementan desde el primer día de exposición a las grandes alturas de Morococha a 4540 m, alcanzando actividades máximas al tercer día para SOD y al día 14 para CAT y GPx; sin embargo, los resultados demuestran que SOD no jugaría un rol muy importante en el sistema antioxidante, pues su actividad disminuye a partir del tercer día hasta alcanzar actividades similares a las del nivel

del mar, no así con CAT ni con GPx, cuyas actividades se incrementan hasta los 14 días que duró el estudio.

CAT y GPx se encargarían de catalizar la formación de H₂O a partir de H₂O₂; sin embargo, las altas concentraciones de hierro cerebral, que pueden alcanzar hasta valores de 21.3 mg / 100 mg⁽³⁹⁾, favorecen la reacción de Fenton y Haber-Weiss y la formación de radicales OH•, radical altamente reactivo que ocasiona y da inicio a la oxidación de proteínas y a la peroxidación lipídica^(17,40), lo que justificaría nuestros resultados relacionados a los altos niveles de CC e hidroperóxidos lipídicos encontrados el primer día de exposición a la altura.

En el presente estudio es evidente un incremento en la formación de CC como marcador de la oxidación de proteínas al primer día de exposición, lo que concuerda con Sahin E. y col, quienes reportan similar incremento de CC en cerebro de ratas en dos modelos de estrés por frío e inmovilización⁽⁷⁾. Los niveles de CC disminuyeron desde el 3er al 14to día por debajo del 65 % de los niveles del grupo control. Radak y col. reportaron también una disminución del 26 % del nivel de CC en el cerebro de ratas expuestas durante 4 semanas a 4000 m de altura simulada en cámara hipobárica⁽¹³⁾. El mayor tiempo de exposición, la diferencia de los modelos experimentales, y el hecho de que en la altura influirían otros factores diferentes a la menor presión parcial de O₂, serían factores a tener en cuenta para explicar las diferencias en la disminución de CC en ambos estudios.

La disminución de CC indicaría la disminución de EROs; sin embargo, se ha demostrado que la exposición a las grandes alturas disminuye la velocidad de síntesis de proteínas y posiblemente incremente su degradación al activar los sistemas proteolíticos^(2,13,15,41). Así, la disminución de CC podría justificarse por el aumento en la concentración de Ca⁺² intracelular en la neurona, que activaría a las proteasas dependientes de calcio: Calpaínas^(41,42), la cuales las degradarían hasta sus unidades aminoácidas, para luego ser reutilizadas en el sistema de recambio proteico. Por otro lado, las proteínas alteradas podrían ser ubiquitinizadas, convirtiéndose en blanco del sistema proteolítico no lisosomal o proteasomal, que también las degradaría hasta aminoácidos.

En el proceso de peroxidación lipídica, los niveles de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) se incrementan desde el primer día de exposición con diferencia significativa en relación al grupo control; a partir del día 3, estos niveles descienden drásticamente siguiendo una tendencia a seguir disminuyendo en el tiempo. Sin embargo, el MDA incrementa sus niveles al primer día de exposición, no variando con el tiempo y en todos los casos se obtuvo diferencia significativa al compararse con el grupo control.

El incremento de los niveles de LOOH y MDA en el 1er día, podría ser explicado por un incremento de la actividad de Fosfolipasa (FLA₂) también desde el 1er día, mediado por el aumento de Ca⁺² intracelular, que liberaría una mayor cantidad de ácidos grasos de la membrana susceptibles al ataque de los EROs, dando inicio a la cadena de peroxidación lipídica⁽²³⁾. Sin embargo, la acumulación de MDA no guarda relación con la disminución de la formación de LOOH, debido quizás al rol protector que cumple la Glutathion peroxidasa (GPx) al catalizar la formación de alcoholes lipídicos a partir de LOOH. En este estudio se determinó un incremento significativo de la actividad de GPx del 1er al 14to día, lo cual justificaría la disminución de los niveles de LOOH debido a que éstos pasaron a su forma alcohólica.

VIII. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos del estudio “Oxidación de proteínas y lípidos en cerebro de cobayos durante la exposición a las grandes alturas (4540 m)”, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La exposición por diferentes tiempos a las grandes alturas influye directamente en el proceso de oxidación de proteínas y lípidos, lo que se evidencia por el aumento inicial de los niveles de CC, LOOH y MDA.
2. La exposición a la altura también influye en la actividad de las enzimas antioxidantes, especialmente en la GPx, que juega un rol importante en la detoxificación de los LOOH, lo cual explicaría la tendencia a la disminución de sus niveles al final del tiempo de estudio.
3. La disminución de los niveles de CC podría deberse a la activación del sistema proteolítico, en especial de las proteasas dependientes de Ca^{+2} como las calpaínas o del sistema proteasomal, las cuales degradarían las proteínas dañadas por las EROs.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villavicencio M. Avances en Bioquímica Médica. Editorial UNMSM. Lima, 2000.
2. Vicedo A, Viñedo Y. Relación del Estrés Oxidativo con el Catabolismo de Proteínas. *Rev. Cubana de Invest. Biomédica* 2001;19(3): 206-12.
3. Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittever FG. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud. *Vet. Mex.* 2002; 33(3): 265-283.
4. Favier A. Comment metre en evidence le stress oxidant chez l'homme sain ou malade. *Myalgies International* 2002; 2 (3): 14-19.
5. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davis MJ. Biochemistry an pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324: 1-18.
6. Tiskow G. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una Breve Revisión. *Gac Cienn Vet.* 1996;1:44-57.
7. Sahin E, Saadet G. Alterations in Brain Antioxidant Status, Protein Oxidation and Lipid Peroxidation in Reponse to Different Stress Models. *Behavioural Brain Research* 2004; 155: 241-248.
8. Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M, Molina-Arjona JA. Alteraciones Mitocondria-les en las Enfermedades Neurodegenerativas. *Rev Neurol* 1998; 26 (11): 112-117.
9. Monge C, León-Velarde F. El Reto Fisiológico de Vivir en los Andes. Editores Científicos. Lima, 2003.
10. Askew EW. Work at High Altitude and Oxidative Stress: Antioxidant Nutrients. *Toxicology* 2002; 180: 107-119.
11. Oyola L, Zúñiga H, Carranza E, Florentini E. Catecolaminas en Sujetos Expuestos a Hipoxia Aguda y Crónica. *Anales de la Facultad de Medicina ISSN* 2002; 63: 1025 – 5583.
12. Jefferson JA, Simoni J, Escudero E, Hurtado ME, Swenson ER, Wesson DE. Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt. Med. Biol.* 2004; 5 (1): 61-9.

13. Radak Z et al. Oxidative Stress Induced by Intermittent Exposure at a Simulates Altitude of 4000m Decreases Mitochondrial Superoxide Dismutase Content in Soleus Muscle of Rat. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1994; 69: 392-395.
14. Yoshikawa T, Furukawa Y. Experimental Hypoxia an Lipid Peroxidation in Rats. *Biochem. Med.* 1982; 27:207-213.
15. Roche E, Romero D. Estrés Oxidativo y Degradación de Proteínas. *Med. Clin.* 1994; 103: 189-196.
16. Elejalde J. Estrés Oxidativo, Enfermedades y Tratamientos Antioxidantes. *Ann Med Intern.* 2001; 18: 326-335.
17. Gutteridge MC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41(12): 1819-1828.
18. Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Arc Pharm.* 2005; 46 (1): 85-95.
19. Elejalde J. Oxidación, entre la Vida y la Enfermedad. *An. Med. Intern.* 2001;18:1-4.
20. Valdés YC, Bilbao M, León JL, Merchán F. Origen e importancia de la Fosfolipasa A₂ de secreción. *Rev. Cubana Farm.* 2002; 36 (2): 121-128.
21. Legards JF, Prost M, Lehucher MP. Le stress oxydatif et ses implications. *Myalgies International* 2002; 2 (3): 4-9.
22. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1992; 6: 2675-2683.
23. Domínguez A. Modificaciones de la superóxido dismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas. *Biotecnología aplicada* 2006; 23: 11-16.
24. Aebi H et al. Catalase in Vivo. *Methods of Enzymatic Análisis Verlag CEIME; Weinheim* 1974: 673-678.
25. 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.
26. Magalhaes J, Duarte J, Ascensao A, Oliveira J, Soares J. O desafio da altitude. Uma perspectiva fisiológica. *Rev.Portuguesa de Ciencias do Desporto* 2002; 2(4): 81-91.
27. Dumer W. Presión barométrica, reducción. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo.* Valencia, 1999.

28. Houston CS.. Oxygen, man and mountains, the mountaineers. *Going Higher*. Seattle, 1998.
29. Bernhardt R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev. Chil Neuro-Psiquiat*. 2004; 42 (4): 281-292.
30. Pajuelo M, Yamada L, Florentini E, Carranza E. Enzimas Antioxidantes en Cerebro de Cobayos Nativos de Altura. *Ciencia e Investigación* 2005; 2: 18-23.
31. Del Maestro RF, McDonald W. Oxidative Enzymes in Tissue Homogenates. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Researche* 1990; 2: 291-296.
32. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method in Enzymol*. 1990; 186: 464- 478.
33. Araujo AL, Radvanyi F. Determination of Phospholipase A2 Activity by a Colorimetric Assay Using a pH Indicador. *Toxicom*. 1987; 25(1): 181-188.
34. Nourooz Z, Sarmadi T. Mesurement of Plasma Hydroperoxides Concentration by Ferrous Oxidation of Xylenol Orange Assay in Conjuntion with Triphenil-phosphine. *Analytical Biochem*. 1994; 220: 403-409.
35. 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 Biochemisty*. 2000; 33 (8): 619-625.
36. McCord. Superoxide Dismutase – an Enzyme Function for Erythrocuprein. *J.B.C*. 1969; 244 (22): 6049-6053.
37. Plagia DE et al. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyteglutathione Peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967; 70: 158-168.
38. Ferrer D, Jorge C, Cutiño I, Ramón CM, Arce DL. Radicales libres y su papel en la homeostasis neuronal. *MEDISAN* 1999; 3 (3): 5-11.
39. Canaval H, Pérez H, Rincón D, Vargas J. Farmacología del hierro. *Asociación Latinoamericana de Farmacología* 2005, 5: 69-86.
40. Braughler JM, Duncan L, Cahse R. The involvement for iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J.B.C*. 1986; 261: 10282-9

41. Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García. Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol*. 2000; 31(4): 333-340.
42. William F. Ganong. *Physiologie Médicale*. De Boeck Université. Paris, 2005.