

## Actividad del sistema de defensa antioxidante y agresión oxidativa en eritrocitos de recién nacidos de bajo de peso y distintas edades gestacionales

B.Q. Patricio Cañas D.<sup>1</sup>; Dr. Manuel Olivares G.<sup>2</sup> Sra. Consuelo Celedón G.<sup>3</sup>;  
T.M. Sandra Llaguno A.<sup>2</sup>; B.Q. Alfonso Valenzuela B.<sup>1</sup>

### Antioxidant enzyme defense system in cord blood from infants

Enzyme activity of antioxidant defense system and oxidative stress have been determined in cord blood of 59 specimens obtained from infants with low birth weight and over a range of gestational ages. Three different enzyme activities of this system have been determined, that is, superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase. There are not significant differences in the activity of these enzymes. However, the levels of malonyldialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, are significantly higher in preterm newborns compared with term newborns. The physiological implications of these results, specially related with fetal erythrocytes behaviour at different gestational ages and its relation with oxygen therapy are discussed.

(Key words: lipid peroxidation, gestational age, premature infants).

El oxígeno es fundamental para la supervivencia de los organismos aeróbicos. Sin embargo, en ciertas condiciones ha sido asociado con efectos tóxicos de algunos tejidos, produciendo displasia bronco pulmonar<sup>1-4</sup> y fibroplasia retrolental<sup>5</sup> enfermedades que son características de los niños de pretérmino.

Para protegerse contra el daño producido por la presencia de radicales libres del oxígeno que se producen al reaccionar O<sub>2</sub> con la hemoglobina o cualquier otra metalo-proteína, el organismo tiene un eficiente sistema de defensa antioxidante, especialmente activo en el eritrocito. Se ha encontrado independientemente que existen altos niveles de catalasa<sup>6</sup> y relativamente menores niveles de glutatión peroxidasa<sup>7</sup> y superóxido dismutasa<sup>8</sup> en eritrocitos, enzimas que pueden metabolizar agua oxige-

nada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y metabolitos activos del oxígeno como el radical libre superóxido (O<sub>2</sub>-) y el radical libre hidroxilo (•OH).

Dado que el eritrocito es una célula con una alta especialización bioquímica, como es el transporte de oxígeno a los tejidos, nosotros nos interesamos en medir el nivel de actividad de estas tres metaloenzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante en niños de bajo peso de nacimiento y de distinta edad gestacional, con el objeto de observar si existen cambios significativos con respecto a estas variables.

Estos resultados pueden tener importancia además, para explicar el comportamiento fisiológico de distintos tipos de eritrocitos y relacionarlos con la edad gestacional. En este sentido, se conoce que los eritrocitos de los niños de término tiene una vida media mayor que los eritrocitos de niños prematuros, esto es, se considera que el proceso de deterioro orgánico es mayor en eritrocitos de niños de menor edad gestacional<sup>9,10</sup>. Uno de los factores que puede influir en el acortamiento de la vida media del eritrocito son los diferentes niveles de lipoperoxidación que en él se producen.<sup>11,12</sup> Para evaluar estos distintos

1. Unidad de Bioquímica Farmacológica. INTA. Universidad de Chile.

2. Unidad de Hematología. INTA. Universidad de Chile.

3. Egresada de la Facultad de Química y Farmacia. Universidad de Chile.

**Tabla 1**  
Distribución de los niños por edad gestacional y peso al nacer (P.N.)

Grupo I:	Edad gestacional	Promedio P.N.
	37 semanas o más	2330 ± 41
	Adecuados n = 7	2302 ± 107
	Pequeños n = 12	
Grupo II:	Edad gestacional	
	35-36 semanas	2246 ± 299
	Adecuados n = 9	1936 ± 264
	Pequeños n = 10	
Grupo III:	Edad gestacional	
	33-34 semanas	1950 ± 250
	Adecuados n = 13	1892 ± 180
	Pequeños n = 10	

P.N.: Peso al nacer ( $\bar{X} \pm D.E.$ )

retos oxidativos, se midieron los niveles eritrocitarios de malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación. Los resultados de esta investigación se discuten de acuerdo a algunos hallazgos fisiológicos que nosotros previamente hemos encontrado en el laboratorio, con respecto al distinto comportamiento prooxidante de la hemoglobina fetal humana (HbF) comparada con hemoglobina adulta (HbA).<sup>1,3</sup>

#### MATERIAL Y METODO

Se tomó sangre del cordón umbilical de 59 niños de distinta edad gestacional provenientes de la maternidad del Hospital Paula Jaraquemada en tubos que contienen EDTA 0,1 mg/mL de sangre. Los eritrocitos se separaron del plasma por centrifugación y se lavaron tres veces con solución de cloruro de sodio 9‰. Las actividades

de las enzimas y la agresión oxidativa se midieron en distintas alicuotas de eritrocitos de acuerdo a los métodos que se describen posteriormente. Los niños que se utilizaron para hacer estas mediciones tenía un peso de nacimiento menor de 2.500 g. Se excluyeron de este estudio todos los niños que presentaron infección, incompatibilidad del grupo Rh, ABO, dificultad respiratoria y malformaciones graves.

La edad gestacional de los recién nacidos se determinó de acuerdo al método de Dubowitz y col.<sup>14</sup>

Los niños a su vez se clasificaron como pequeños y adecuados para la edad gestacional de acuerdo a las tablas de Lubchenko.<sup>15</sup>

Se tomaron tres grupos de niños con distinta edad gestacional que se subclasificaron como adecuados y pequeños para la edad gestacional, como se describe en la tabla 1.

Las enzimas se midieron tomando alicuotas de la suspensión de eritrocitos de acuerdo a métodos previamente descritos en la literatura y realizados en el laboratorio. Para determinar la actividad de la cuproenzima superóxido dismutasa se utilizó el método Winterbourn y col.<sup>16</sup> como se describió anteriormente.<sup>17</sup> La enzima catalasa fue medida de acuerdo al método de la cinética de utilización de NADPH.<sup>19</sup>

Los niveles de lipoperoxidación o agresión oxidativa del eritrocito se midieron determinando el malondialdehído (MDA) formado, con el método de Fee y Teitelbaum.<sup>20</sup>

Todas las mediciones se expresaron en unidades o  $\mu$ moles por gramo de hemoglobina (gHb). La hemoglobina se determinó de acuerdo al método de Drabkin.<sup>21</sup>

Para determinar si las diferencias eran significativas entre los distintos grupos de edad gestacional y peso al nacer estudiados se usó la prueba de Student para datos no pareados.<sup>22</sup>

#### RESULTADOS

La tabla 2 muestra la actividad de las tres

**Tabla 2**  
Actividad de enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante en niños de distinta edad gestacional (EG) y peso al nacer (PN).

	U. CAT	U. GASH Px	U. SOD
<b>Grupo I</b>			
Adecuado n = 7	105,9 ± 43,1	1,25 ± 0,25	2.307 ± 293,0
Pequeño n = 12	138,8 ± 47,2	1,49 ± 0,52	2.358 ± 673,0
<b>Grupo II</b>			
Adecuado n = 9	78,44 ± 23,3	1,40 ± 0,35	1.512 ± 672,2
Pequeño n = 8	128,6 ± 44,9	1,68 ± 0,46	1.806 ± 850,4
<b>Grupo III</b>			
Adecuado n = 13	133,8 ± 60,5	1,80 ± 0,41	1.597 ± 685,0
Pequeño n = 10	87,3 ± 42,6	1,46 ± 0,27	1.917 ± 439,6

U. CAT = Unidades de catalasa por gramo de hemoglobina

U. GSH Px = Unidades de glutatión peroxidasa por gramo de hemoglobina

U. SOD = Unidades de superóxido dismutasa por gramo de hemoglobina

**Tabla 3.**  
Concentración de MDA  $\mu\text{moles/gHb}$  ( $\bar{X} \pm \text{D.E.}$ ) en distintos grupos de edad gestacional (EG) y peso para la misma

Peso al nacer	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Adecuado (a)	$0,11 \pm 0,02^{++}$	$0,26 \pm 0,7^+$	$0,31 \pm 0,07^*$
Pequeño (p)	$0,08 \pm 0,02^+$	$0,20 \pm 0,11$	$0,28 \pm 0,11^+$

Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.  
 + Grupo Ia vs Grupo IIa  $p < 0,02$   
 Grupo Ip vs Grupo III  $p < 0,01$   
 \* Grupo Ia vs Grupo IIIa  $p < 0,05$

enzimas estudiadas (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) expresadas como unidades por gHb. No hay diferencias significativas entre los distintos grupos de edad gestacional y tamaño para las mismas. Tampoco existen diferencias dentro de los mismos grupos según el

peso al nacer. Por otra parte, como una forma de evaluar la diferente agresión oxidativa a que están expuestos los eritrocitos, se midieron los niveles de MDA (tabla 3) expresados en moles/gHb. En estas determinaciones se encontraron diferencias significativas entre los niños de pretérmino

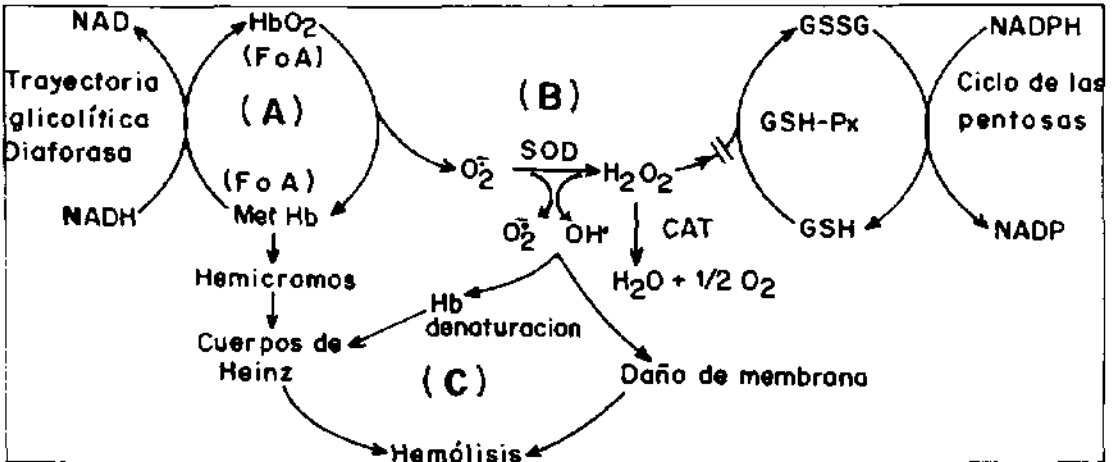


Figura: Mecanismos de defensa antioxidante en eritrocitos fetales y adultos:

- A) Autooxidante de la hemoglobina (Hb) fetal (F) o adulta (A) humana genera metahemoglobina (MetHb) y radicales libres de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) que pueden ser metabolizados por diferentes enzimas del sistema de defensa antioxidante. La MetHb formada a su vez puede ser transformada por la enzima diaforasa y NADH formado en la trayectoria glicolítica a oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ).
- B) Sistema de defensa antioxidante formado por superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px) que requiere glutatión reducido (GSH) y la forma de glutatión oxidado (GSSG) que puede ser metabolizado por enzimas del ciclo de las pentosas en presencia de NADPH y regenerar glutatión reducido (GSH).
- C) La acumulación de especies de oxígeno activado por la ausencia de antioxidantes o por disminución de la actividad del sistema de defensa antioxidante puede producir acumulación de especies activas del oxígeno ( $\text{O}_2$ ;  $\text{OH}^\bullet$ ) que pueden producir daño de la membrana o denaturación de la hemoglobina con formación de cuerpos de Heinz, factores que pueden causar hemólisis.

(Grupo II y Grupo III) con respecto a los niveles de MDA de los niños de término (Grupo I). Sin embargo, no hay diferencias significativas en un mismo grupo entre los niños clasificados como de peso gestacional adecuado con respecto a los niños de peso pequeño al nacer.

Estos resultados indican que hay una diferencia significativa en los niveles de agresión oxidativa entre los niños de pre término y los de término, siendo mayor la agresión oxidativa a medida que disminuye la edad gestacional.

## DISCUSION

La importancia de los resultados descritos anteriormente puede entenderse mejor al considerar la relación que existe entre las diferentes formas parcialmente reducidas del oxígeno y las enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante, como se describe en la figura.

Según la figura 1 el paso de oxi Hb ( $Fe^{+2}$ ) a meta Hb ( $Fe^{+3}$ ) puede generar radicales superóxidos ( $O_2^-$ ) que pueden generar a su vez el radical libre de hidroxilo y agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), compuestos que a su vez pueden dañar las membranas y otros componentes celulares. La generación de radicales superóxidos, durante la autooxidación de la hemoglobina, fue inicialmente demostrada en los trabajos de Misra y Fridovich.<sup>23</sup>

Así también, se ha encontrado una disminución de la actividad de algunas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante en algunas patologías como las anemias de Fanconi.<sup>24</sup> Las alteraciones provocadas por la generación de estos radicales libres del oxígeno en daños producidos en la membrana del glóbulo rojo ha sido estudiada por Jain<sup>25,26</sup> en pacientes con anemia falciforme. Los resultados encontrados en la tabla con respecto a los mayores niveles de malondialdehído formado en eritrocitos de niños de pretérmino (Grupo II y III) comparado con los niveles de MDA de los niños de término (Grupo I), pueden indicar que existen diferencias en la capacidad de generar radicales superóxidos entre ambos eritrocitos, a pesar de tener una misma dotación de enzimas del sistema de defensa antioxidante (tabla 3).

Una posible explicación de este hecho puede residir en la diferente proporción de HbF con

respecto a HbA durante la gestación, como fue informado por Bard.<sup>27</sup> Nosotros hemos demostrado recientemente en el laboratorio que ambas hemoglobinas humanas tienen una diferente capacidad prooxidante en su estado de oxihemoglobina.<sup>13</sup> Esta hipótesis puede ser cierta ya que la relación entre ambas hemoglobinas (HbF/HbA) disminuye en forma proporcional durante la gestación, siendo mayor en los niños de pretérmino (Grupo II y Grupo III) con respecto a los niños de término (Grupo I).

Otro factor que puede contribuir a la mayor cantidad de especies de radicales libres del oxígeno, además de la relación entre ambas hemoglobinas, es la diferente cantidad de vitamina E (Vit E) en los niños de término con respecto a los niños de pretérmino.<sup>28</sup>

Aunque nosotros no podemos afirmar que existen diferencias en los niveles de esta vitamina en los niños aquí estudiados, es un hecho conocido que la susceptibilidad de los glóbulos rojos se altera por modificaciones nutricionales durante la evolución extrauterina del recién nacido de bajo peso, especialmente, en niños con menos de 1.500 g al nacer.<sup>29-31</sup>

Los resultados de esta investigación aunque no determinan qué factores específicos contribuyen a modificar el estrés oxidativo de los eritrocitos, demuestran que no hay una distinta capacidad del sistema de defensa enzimática de actividad antioxidante, en cuanto a los grupos de distinta edad gestacional y peso al nacer, aquí estudiados.

Los resultados que se obtienen de la literatura a este respecto son más bien contradictorios y parciales, ya que generalmente sólo se refieren a los niveles de una de las enzimas y además están sujetos a diferentes tipos de variaciones.<sup>32,33</sup> Sin embargo, los resultados informados aquí se parecen a aquellos informados por Autor y col.<sup>34</sup> quien no encuentra que existan diferencias importantes en los niveles de su superóxido dismutasa.

El valor de esta investigación, con respecto a los datos obtenidos anteriormente de la literatura, radica en que en este estudio se midió el nivel de las tres enzimas más importantes del sistema de defensa antioxidante simultáneamente, en niños de bajo peso al nacer, donde existe un mayor riesgo de contraer algunas enfermedades que pueden requerir  $O_2$ -terapia.<sup>35</sup> Considerando estos resultados creemos que es necesario hacer estudios con niños de menor edad gestacional, en los cuales la deficiencia de Vitamina E, los hace

más susceptibles de contraer ciertas patologías relacionadas con agresión oxidativa.<sup>36</sup>

### RESUMEN

Se analizaron en este estudio muestras de sangre de cordón umbilical de 59 niños de bajo peso al nacer y distinta edad gestacional, obtenidas de la Maternidad del Hospital Paula Jaraquemada. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en estos niños con respecto a edad gestacional y peso al nacer. Los eritrocitos de los niños de pretérmino tenían, sin embargo, un mayor nivel de malondialdehído (MDA) que los eritrocitos de los niños de término. Esto puede determinar que los eritrocitos están expuestos a distinta agresión oxidativa de acuerdo a la edad gestacional. Más estudios son necesarios para establecer una relación de estos resultados y el comportamiento fisiológico de los eritrocitos a distinta edad gestacional y la relación de estos hechos con la etiología de distintos tipos de anemia que sufren estos niños después de nacer.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece la asistencia técnica del Sr. Ricardo Guerra quién hizo las determinaciones de enzimas y el manejo de las muestras.

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Chile, Proyecto DIB B-1399-8613.

### REFERENCIAS

1. *Autor A.P., Roberts R.J.*: Superoxide dismutase activity and isoenzymes in the human fetal and adult lung. *Fed. Proc.*, 1974; 33: 1505-1510.
2. *Northway W.H., Rosen R.C., Porter D.Y.*: Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease, *New Engl J Med* 1967; 276: 357-358.
3. *Roberts R., Frank L., Autor A.*: Superoxide dismutase: An enzyme of maturation - Relationship of IRDS. *Pediatr Res* 1975; 9: 136-139.
4. *Crapo J.D. and Tierney D.F.*: Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Amer J Physiol* 1974; 225: 1404-1408.
5. *James L.S., and Lanman J.T. Ed.*: History of oxygen therapy and retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 1976; 57: 591-595.
6. *Aebi H., Bossi E., Cantz M., Matsubara S., Suter H.*: A catalasemia in Switzerland. En: *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism* (Ed). Beutler, E. pp. 41-65 (1968).
7. *Cohen G., Hochstein P.*: Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 1963; 2: 1420-1426.
8. *Lynch R.E., Lee G.R., Cartwright G.E.*: Inhibition of superoxide dismutase of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. *J Biol Chem* 1976; 251: 1015-1018.
9. *Pearson H.A.*: Life span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967; 70: 166-168.
10. *Bratteby L.E.*: Studies on erythrokinetics in infancy. *Acta Paediatr Scand* 1968; 57: 311-320.
11. *Valenzuela A., Videla L.A.*: Citotoxicidad del oxígeno, aspectos biológicos y médicos. *Rev Med Chile* 1983; 111: 829-836.
12. *Fridovich I.*: The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-876.
13. *Valenzuela A., Guerra R., Lazzcano L., Cañas P.*: Differential prooxidative effects of adult and fetal hemoglobin. *Febs. Letters* 1986; 196: 353-356.
14. *Dubowitz L., Dubowitz W., Goldberg C.*: Clinical assessment of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1970; 77: 1-10.
15. *Lubchenko L.O., Hansman C., Pressler M., Boyd E.*: Intrauterine growth as estimated from live born birth weight data at 24 to 42 weeks of gestation *Pediatrics* 1963; 32: 793-795.
16. *Wintherbourn C., Haekins R., Brain M., Carral R.*: The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337-339.
17. *Uauy R., Castillo-Duran C., Fisberg M., Fernández N., Valenzuela A.*: Red cell superoxide dismutase activity as an index of human copper nutrition. *J Nutr* 1985; 115: 1650-1655.
18. *Maral J., Piget K., Michelson A.*: Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Comm* 1977; 77: 1525-1535.
19. *Paglia D.E., Valiente W.M.*: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-160.
20. *Fee J.A., Teitelbaum H.D.*: Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. *Biochem. Biophys Res Commun* 1972; 49: 150-153.
21. *International Committee for Standardization in Haematology Recommendations and requirements for haemoglobinometry in human blood.* *J Clin Path* 1965; 16: 353-355.
22. *Weber, E. En: Grundriss der Biologischen Statistik,* Gustav Fisher Verlag, Ed 1967; 252-258.
23. *Misra H., Fridovich, I.*: The generation of superoxide radicals during autooxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; 247: 6960-6962.
24. *Mavelli I., Ciriolo M.R., Rotilio G.*: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anemia erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 106: 286-290.
25. *Jain S.K., Shohet S.B.*: A novel phospholipid in irreversibly sickled cells; evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood* 1984; 63: 362-367.
26. *Jain S.K., Mohandas S.M., Clark M., Shohet, S.B.*

- The effect of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, on the deformability, dehydration and  $^{51}\text{Cr}$ -survival of erythrocytes. *Brit J Haematol* 1983; 53: 247-255.
27. *Bard H.*: Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J. Clin Invest* 1973; 52: 1789-1795.
  28. *Gross S.*: Hemolytic anemia in premature infants: relationship to vitamin E, Selenium and glutathion peroxidase and erythrocyte lipids. *Seminars in Hematology* 1976; 13: 187-201.
  29. *Hassan H., Hashim S.A., Van Italie T.B.*: Syndrome in premature infants associate with low plasma Vitamin E levels and high polyunsaturated fatty acid diet. *Am J Clin Nutr* 1966; 19: 147-151.
  30. *Oski I.A., Barness L.A.*: Vitamin E deficiency: A previously unrecognized cause of hemolytic anemia in the premature infant. *J Pediatr* 1967; 70: 211-214.
  31. *Zipurski A.*: Vitamin E deficiency anemia in newborn infants. *Clin Perinatology* 1984; 11: 393-402.
  32. *Salk L.A., Hsieh H., Baricos W.H., Shapira, E.*: Enzymatic and immunological quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages. *Pediatr Res* 1982; 16: 933-936.
  33. *Bonta B.W., Gawron E.R., Warsaw J.B.*: Neonatal red cell superoxide dismutase enzyme levels: Possible role as a cellular defense mechanism against pulmonary oxygen toxicity. *Pediatr Res* 1977; 11: 754-757.
  34. *Autor A.P., Frank L., Roberts R.T.*: Developmental characteristics of pulmonary. Superoxide dismutase: Relationship to idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 1976; 10: 154-158.
  35. *Frank L., Groseclose F.*: Oxygen toxicity in newborn rats: the adverse effects of undernutrition. *J Appl Physiol Respirat Environ. Exercise Physiol* 1982; 53: 1248-1255.
  36. *Cynamon H.A., Isenberg J.M., Mgufen Co. H.*: Erythrocyte malonondialdehyde release in vitro: a functional measure of Vitamin E Status. *Clin Chim Acta* 1985; 151: 169-176.