

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana  
Centro de Investigaciones Biomédicas

## EFECTO DE LA $\alpha$ -CRISTALINA BOVINA EN LA RESPUESTA OXIDATIVA DE LOS POLIMORFONUCLEARES Y EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

*Lic. Celia Bauby, Lic. Dahis Manzanares, Lic. Cheyla Romay, Lic. Rosa Sánchez, Lic. Jorge L. López, Lic. Roberto de la Peña y Dr. José C. García*

### RESUMEN

Se determinó la quimioluminiscencia de polimorfonucleares activados con zimosán, en presencia de  $\alpha$ -cristalina (0,25; 0,5; 1 mg/mL), y con 1 mg/mL de la proteína se efectuó el ensayo en 3 momentos diferentes (con  $\alpha$ -cristalina preincubada, adicionada a la vez y después de 8 min de aplicado el zimosán). Tanto la preincubación de la  $\alpha$ -cristalina con polimorfonucleares, como su adición 8 min después de desatada la respuesta oxidativa, disminuyeron significativamente la quimioluminiscencia respecto al control ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,005$ , respectivamente). La  $\alpha$ -cristalina provocó una disminución 4 veces mayor que la albúmina de los derivados oxidados del ácido tiobarbitúrico, de manera dependiente de la concentración. Estos resultados preliminares demuestran que la  $\alpha$ -cristalina tiene actividad antioxidante al disminuir las especies reactivas del oxígeno de neutrófilos activados con zimosán, e inhibir la lipoperoxidación espontánea de cerebro de rata. Ambos efectos antioxidantes pudieran contribuir a la protección del cristalino del ojo.

*Descriptores DeCS:* CRISTALINAS/uso terapéutico; ANTIOXIDANTES/uso terapéutico; NEURÓFILOS; PEROXIDACIÓN DE LÍPIDO.

La  $\alpha$ -cristalina es la proteína más abundante del lente ocular de los vertebrados, aunque también se encuentra expresada en otros tejidos. Al igual que otras proteínas del grupo de las pequeñas proteínas de estrés térmico tiene actividad chaperona, al proteger a otras proteínas y enzimas de la agregación por calor y radiaciones UV.<sup>1,2</sup> El humor acuoso y el cristalino contienen altos niveles de  $H_2O_2$  (20-50  $\mu$ mol),<sup>3</sup> por lo que el estudio de la actividad antioxidante de dicha proteína es

de gran interés. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de la  $\alpha$ -cristalina en 2 modelos *in vitro* independientes del cristalino, en polimorfonucleares (PMN) activados y en homogenato de cerebro de rata.

### MÉTODOS

*Ensayo de quimioluminiscencia (QL):* Se utilizó el procedimiento descrito por

Pascual y otros,<sup>4</sup> para evaluar el efecto de la  $\alpha$ -cristalina (0,25; 0,5; 1 mg/mL) en la QL amplificada por luminol de PMN activados con zimosán opsonizado. Se evaluó también el efecto de la adición de la  $\alpha$ -cristalina (1 mg/mL) en 3 momentos diferentes (durante la preincubación, en el momento de inicio de la activación y después de 8 min de añadido el zimosán). La QL fue medida en un luminómetro LKB Wallac 1250 acoplado a un recorder LKB 2210.

**Ensayo de inhibición espontánea de la peroxidación:** Se preparó un homogenato de cerebro de ratas Wistar en *buffer* fosfato (pH 7,4), y se centrifugó a 3 000 rpm, por 10 min a 4 °C. Se tomaron alícuotas del sobrenadante y se incubaron a 37 °C por 60 min en presencia de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -cristalina (0; 0,28; 0,42; 0,7; 1,4 mg/mL) y de albúmina bovina como proteína control. La peroxidación fue medida por la absorción a 535 nm de los derivados oxidados del ácido tiobarbitúrico.<sup>5</sup>

## RESULTADOS

En la figura 1 se muestra una dependencia de la concentración de  $\alpha$ -cristalina en la disminución de la QL. La concentración de 1 mg/mL disminuyó en 60 % la QL de los PMN activados con zimosán opsonizado, con significación respecto al control ( $p < 0,005$ ). Tanto la preincubación de la  $\alpha$ -cristalina con PMN, como su adición 8 min después de desatada la respuesta oxidativa, disminuyeron significativamente la QL respecto al control ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,005$ , respectivamente). La figura 2 muestra que la  $\alpha$ -cristalina provocó una disminución en la lipoperoxidación espontánea del homogenato de cerebro de rata, de manera dependiente de la concentración y 4 veces superior a la albúmina para concentraciones semejantes.

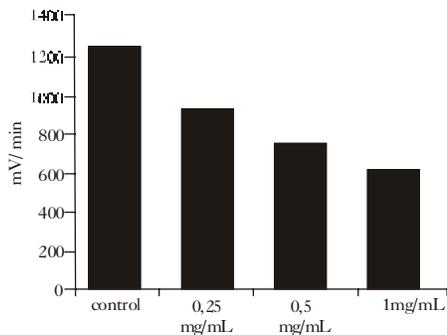


Fig. 1. Efecto de diferentes concentraciones de  $\alpha$ -cristalina en la respuesta oxidativa de polimorfonucleares (PMN) activados con zimosán.

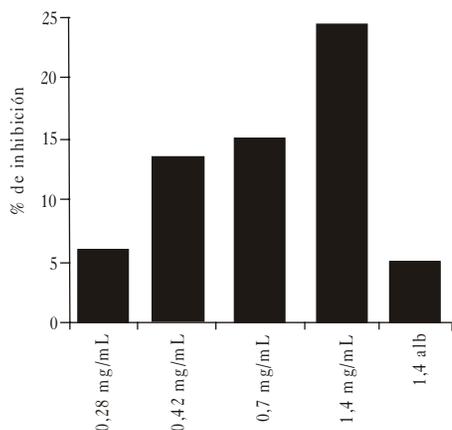


Fig. 2. Efecto de la  $\alpha$ -cristalina en la lipoperoxidación espontánea de cerebro de rata.

## DISCUSIÓN

Estos resultados preliminares demuestran la actividad antioxidante de la  $\alpha$ -cristalina al disminuir las especies reactivas del oxígeno (EROS) de PMN activados con zimosán, e inhibir la lipoperoxidación espontánea de cerebro de rata. La capacidad de la  $\alpha$ -cristalina de asociarse con lípidos para ejercer su función antioxidante pudiera formar parte de su mecanismo de protección lipídica. Borchman y Tang<sup>6</sup> sugieren que la protección puede estar mediada por la exclusión de agua de las cabezas polares y así proteger a los lípidos de los oxidantes

hidrofílicos. La disminución de la respuesta oxidativa de PMN activados demuestra que no es necesaria la incubación previa, pues de igual manera disminuye la QL cuando es adicionada 8 min después de desatada la cascada oxidativa.

De estos últimos resultados se pudieran inferir una acción directa sobre el

atrapamiento de EROS, protección de las enzimas de defensa del estrés oxidativo, o una participación en otro proceso posterior al ensamblaje del complejo NADPH oxidasa. Ambos efectos antioxidantes pudieran contribuir al mantenimiento de la transparencia del cristalino.

## SUMMARY

The chemiluminescence of zimosan-activated polymorphonuclears in the presence of alpha crystallins was determined (0,25; 0,5; 1 mg/mL) and the assay was performed with 1 mg/mL of the protein at 3 different moments (with pre-incubated alpha crystallin, with alpha crystallin added at the same time as zimosan and 8 minutes after adding the latter). Both the alpha crystallin preincubation with polymorphonuclears and its addition 8 minutes after the oxidative response occurred significantly reduced chemiluminescence as compared to control. ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,005$  respectively). Alpha crystallin caused a reduction that was 4 times that of the albumin of oxidized derivatives of thiobarbituric acid, depending on the concentrations found. These preliminary result showed that alpha crystallin had an antioxidant activity since it lowers the reactive oxygen species of zimosan-activated neutrophils and inhibits spontaneous lipid peroxidation in rat brain. Both antioxidant effects may contribute to crystallin lens protection.

*Subject headings:* CRYSTALLINS/therapeutic use; ANTIOXIDANTS/therapeutic use; NEUTROPHILS; LIPID PEROXIDATION.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horwitz J. Alpha crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10449-53.
2. Horwitz J. The function of alpha crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:10-22.
3. Smith JB, Jiang X, Abraham EC. Identification of hydrogen peroxide oxidation sites of alpha A and alpha B crystallins. *Free Rad Res* 1997;26:103.
4. Pascual C, González R, Romay C. Drugs effects on superoxide generation and chemiluminescence response of human leukocytes. *Agents Actions* 1991;32:277-82.
5. Ozdemirler. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patient with diabetes mellitus and myocardial infarction. *Horm Metab Res* 1995;27:194.
6. Borchman D, Tang D. Binding capacity of alpha crystallin to bovine lens lipids. *Exp Eye Res* 1996;63:407-10.

Recibido: 10 de febrero del 2000. Aprobado: 18 de mayo del 2000.

Lic. *Celia Bauby*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.