



Universidad de Valparaíso

Escuela de Kinesiología

Facultad de Medicina

**“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELO
ROEDOR CON KETAMINA”**

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA**

AUTORA: ZINNIA FUENZALIDA SÁNCHEZ

PROFESORES GUÍAS: MARILYN PAZ ARAOS, MSc.

MARCO FUENZALIDA NUÑEZ, PhD

Escuela de Kinesiología

Facultad de Medicina

Universidad de Valparaíso

Viña del Mar - Chile

2018



Universidad de Valparaíso

Escuela de Kinesiología

Facultad de Medicina

**“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELO
ROEDOR CON KETAMINA”**

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA**

AUTORA: ZINNIA FUENZALIDA SÁNCHEZ

PROFESORES GUÍAS: MARILYN PAZ ARAOS, MSc.

MARCO FUENZALIDA NUÑEZ, PhD

Escuela de Kinesiología

Facultad de Medicina

Universidad de Valparaíso

Viña del Mar - Chile

2018

DEDICATORIA

“A mis padres Rita Sánchez y Sergio Fuenzalida, a quienes admiro y amo enormemente, les agradezco cada día de mi vida, son maravillosos maestros”.

Zinnia Fuenzalida Sánchez

AGRADECIMIENTOS

“A Marilyn Paz Araos, Marco Fuenzalida Núñez y Carlos Jara Gutiérrez gracias por hacer posible esta tesis, por guiar mi camino dentro del mundo de la investigación, por su gran apoyo, cariño y por instruir con excelencia cada día”.

Zinnia Fuenzalida Sánchez

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
ABREVIATURAS Y/O SIGLAS	xi
ABSTRACT	xiv
RESUMEN	xv
1.INTRODUCCIÓN	1
2.MARCO TEÓRICO	3
2.1 Esquizofrenia	3
2.2 Estadios de la esquizofrenia	4
2.2.1 Estadio prodrómico	4
2.2.2 Estadio inicial	5
2.2.3 Estadio conclamado	5
2.2.4 Remisión o estabilización	5
2.2.5 Estadio terminal o irreversible	5

2.3 Epidemiología	6
2.4 Costos asociados	6
2.5 Fisiopatología	7
2.5.1 Hipótesis del neurodesarrollo	7
2.5.2 Hipótesis dopaminérgica	8
2.5.3 Hipótesis glutamatérgica	8
2.5.4 Hipótesis Serotoninérgica	9
2.6 Estrés oxidativo	10
2.6.1 Radicales libres	11
2.6.2 Formación de especies reactivas del oxígeno	12
2.6.2.1 Anión superóxido	13
2.6.2.2 Peróxido de hidrogeno	13
2.6.2.3 Radical hidroxilo	14
2.6.3 Formación de especies reactivas del nitrógeno	15
2.6.3.1 Óxido nítrico	15
2.6.3.2 Peroxinitrito	16
2.6.4 Fuente de especies reactivas	16

2.6.5 Sistema de defensa antioxidante	17
2.6.5.1 Antioxidantes enzimáticos	20
2.6.5.1.1 Superóxido dismutasa	20
2.6.5.1.2 Catalasa	20
2.6.5.1.3 Sistema glutatión	21
2.6.5.2 Antioxidantes no enzimáticos	22
2.7 Estrés oxidativo y esquizofrenia	24
2.8 Evidencia de daño oxidativo en la esquizofrenia	26
2.8.1 Estudios clínicos	26
2.9 Evidencia de tratamiento antioxidante en esquizofrenia	27
2.10 Modelo animal en esquizofrenia	28
2.10.1 Modelo ketamina	28
2.11 Evidencia de estrés oxidativo en modelo ketamina	29
3. HIPÓTESIS / OBJETIVO GENERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4.MATERIALES	32
4.1 Instrumentos de medición	32
4.2 Equipos	32

4.3 Reactivos para determinar parámetros REDOX	33
5. MÉTODO	34
5.1 Animales de experimentación	34
5.1.1 Grupos de experimentación	34
5.1.2 Generación de unidades experimentales	35
5.1.3 Modelo roedor ketamina	35
5.2 Recolección de la muestra	36
5.3 Determinación de biomarcadores REDOX	38
5.3.1 Determinación de daño oxidativo	39
5.3.2 Determinación de defensa antioxidante	40
5.4 Análisis estadístico	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Daño oxidativo	42
6.2 Capacidad antioxidante total	43
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIÓN	48
9. REFERENCIAS	49

10. ANEXOS	53
10.1 Anexo 1	53

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de Tablas

Tabla 1. Síntomas de la esquizofrenia	4
Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno y su formación	14
Tabla 3. Peroxinitrito y su formación	16
Tabla 4. Antioxidantes enzimáticos endógenos y exógenos	22
Tabla 5. Variables del estudio	37

Índice de figuras

Figura 1. Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno	17
Figura 2. Interacción de radicales con mecanismos antioxidantes	18
Figura 3. Clasificación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos	19
Figura 4. Sistema de defensa antioxidante enzimático	21
Figura 5. Lipoperoxidación en tejido sanguíneo	43
Figura 6. Capacidad antioxidante total	44

ABREVIATURAS Y/O SIGLAS

ABTS: 2,2'-azinobi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ABAP: 2,2'-azobis (2-amidinopropano)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CAT: Catalasa

Cu: Cobre

e⁻: Electrón

Fe²⁺: Ion Ferroso 2

Fe³⁺: Ion Ferroso 3

GPx: Glutati3n peroxidasa

GR: Glutati3n reductasa

Gr: Gl3bulo rojo

GSH: Glutati3n reducido

GSS: Glutati3n oxidado

GSSG: Glutati3n disulfuro

H⁺: Hidrogeni3n

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno.

LP: Lipoperoxidación

Mn: Magnesio

MDA: Malondialdehído

NAC: N-acetil cisteína

NADH: Nicotinamina Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NOS: Óxido nítrico sintasa

O₂: Oxígeno

O₂^{•-}: Anión Superóxido

OH[•]: Radical de Hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Óxido nítrico

ONOO⁻: Peroxinitrito

pH: Potencial de Hidrógeno

REDOX: Reacción de Reducción-Oxidación

RNS: Especies reactivas del Nitrógeno

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Ácido tiobartitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobartitúrico

TCA: Ácido tricloro acético

TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox.

TRAP: Total Reactive Antioxidant Properties

Zn: Zinc

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe, generally chronic disease that is classified as functional psychotic disorders, which limit the activities of daily life and the participation of people who suffer from it. The mechanisms underlying this disease are poorly understood, however there is evidence that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of schizophrenia. Ketamine has been used to induce a condition similar to schizophrenia as an animal model in which to study this condition. In the present study, the parameters of oxidative stress in the mouse model intervened with ketamine were evaluated. The general objective of this research is to evaluate the oxidative stress profile in blood tissue in the rodent model of schizophrenia. For this purpose, the parameters of oxidative damage MDA and radical sequestering potential must be determined by TRAP. The total number of animals used will be 30. The procedure for measuring lipoperoxidation was based on the method postulated by Estarbauer et al (1987) and the total antioxidant capacity (TRAP) is based on the quantification of the discoloration of the ABTS radical postulated by Romay et al (1996). The results obtained in TBARS that extrapolate oxidative damage showed that there are no significant differences. In TRAP the results show significant differences of the control group compared with the vehicle and model ketamine.

Key Words: Oxidative stress, TBARS, TRAP, Ketamine, Schizophrenia.

RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad severa, generalmente crónica que se clasifica dentro de los trastornos psicóticos funcionales, los cuales limitan las actividades de la vida diaria y la participación de las personas que la padecen. Los mecanismos subyacentes a esta enfermedad son poco conocidos sin embargo hay evidencia de que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la esquizofrenia. La ketamina se ha usado para inducir una condición similar a la esquizofrenia como modelo animal en el que estudiar esta condición. En el presente estudio se evaluó los parámetros de estrés oxidativo en modelo de ratón intervenido con ketamina. Esta investigación tiene como objetivo general evaluar perfil de estrés oxidativo en tejido sanguíneo en modelo roedor de esquizofrenia. Para lo cual se deberá determinar los parámetros de daño oxidativo MDA y potencial secuestrante de radical mediante TRAP. El número total de animales utilizados será de 30. El procedimiento para medición de lipoperoxidación se basó en el método postulado por Estarbauer y cols (1987) y la capacidad antioxidante total (TRAP) se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS postulado por Romay y cols (1996). Los resultados obtenidos en TBARS que extrapola daño oxidativo arrojó que no hay diferencias significativas. En TRAP los resultados muestran diferencias significativas del grupo control comparado con el vehículo y modelo ketamina.

Palabras Claves: Estrés oxidativo, TBARS, TRAP, Ketamina, Esquizofrenia.

INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia (SQZ) es una enfermedad mental severa la cual se presenta en el 1% de la población a nivel mundial (Perälä & cols, 2007), que con frecuencia tiene un curso crónico o recurrente con brotes sucesivos (Mingote y cols, 2007), caracterizados por alteraciones sustanciales y específicas de la percepción, del pensamiento y de las emociones, que comprometen las funciones esenciales que dan a la persona normal la vivencia de su individualidad, singularidad y dominio de sí misma y suelen, por tanto, alterar de forma muy importante la vida de las personas que las padecen (MINSAL, 2009)

En Chile solo el 0,51% de las personas que padece esta enfermedad refiere síntomas. Los cuales se clasifican en síntomas positivos, síntomas negativos, síntomas cognitivos y síntomas afectivos (MINSAL,2009)

En general, la SQZ se considera una enfermedad compleja con múltiples factores asociados a la patogenia, explicada bajo las teorías dopaminérgica, glutamatérgica, serotoninérgica y del neurodesarrollo (Saiz, De la Vega, Sánchez., 2010)

En la actualidad se ha evidenciado que el estrés oxidativo (EO) contribuye también a la fisiopatología. En particular, se sabe que el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN dada en la SQZ afecta la viabilidad y función celular, lo que puede explicar posteriormente el curso de deterioro de la enfermedad (Flatow et al., 2013). La evidencia también apunta hacia una alteración en las actividades de antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. De hecho, los modelos experimentales han demostrado que el EO induce anomalías conductuales y moleculares notablemente similares a las observadas en la SQZ (Bitanhirwe y Woo, 2012). Los hallazgos sugieren también que EO está íntimamente relacionado con una variedad de procesos fisiopatológicos como inflamación, anomalías oligodendrocíticas, disfunción mitocondrial, hipoactividad de receptor ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Bitanhirwe y Woo, 2012).

Considerando lo anterior, la evaluación de parámetros de estrés oxidativo entrega una visión del estado REDOX comprometido, en los episodios esquizofrénicos que podrían coadyuvar a la activación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia.

MARCO TEÓRICO

Esquizofrenia

La SQZ del griego *σχίζειν schizein* (dividir) y *φρήν phrēn* (mente), es una enfermedad mental grave (Makenna y cols. 2007; Hirsch y Weinberger, 2003), que con frecuencia tiene un curso crónico o recurrente con brotes sucesivos, que interfiere con las funciones mentales limitando así la capacidad del paciente en la realización de sus actividades de la vida diaria, restringiendo su participación en ámbitos de relaciones e interacciones interpersonales, actividad comunitaria, laboral, educativa, cívica y social (Mingote y cols, 2007).

Según la guía clínica para el tratamiento de personas desde el primer episodio de SQZ del ministerio de salud del 2009, las manifestaciones propias de la patología son conceptualizadas como pertenecientes a cuatro grandes

dimensiones: Síntomas positivos, síntomas negativos, síntomas cognitivos y síntomas afectivos (Tabla 1).

Tabla 1: Síntomas de la esquizofrenia

Síntomas positivos	Síntomas afectivos	Síntomas negativos	Síntomas cognitivos
Ideas delirantes Alucinaciones Catatonia Agitación	Disforia Desesperanza Ideas e intentos suicidas Hostilidad Impulsividad Conducta antisocial	Apatía Discurso desorganizado Conducta desorganizada Retraimiento emocional Retraimiento social Pensamiento estereotipado Alogia Anhedonia	Déficit de atención Déficit en la memoria Déficit procesamiento de información Pobreza ideativa Déficit en funciones ejecutivas

Estadios de la Esquizofrenia

Estadio prodrómico: Se caracteriza por dificultades para el aprendizaje académico (déficit de concentración, memoria, etc.), pérdida de interés e iniciativa y tendencia al aislamiento social, síntomas inespecíficos que pueden interferir e incluso impedir el estudio y/o el trabajo eficiente. La fase prodrómica suele durar entre 2 y 5 años, durante este tiempo la persona presenta síntomas

inespecíficos (ansiedad, insomnio, depresión, etc.) así como un progresivo deterioro funcional y social. (Mingote et al., 2007)

Estadio inicial: Puede ser un inicio abrupto mediante crisis o brotes alucinatorios delirantes, o bien cursar con un inicio lentamente progresivo, de manera tórpidamente y poco llamativa. En el primer caso suele tratarse de un cuadro tan aparatoso que se produce el ingreso psiquiátrico, mientras que en el segundo puede pasar desapercibido más tiempo (Mingote et al., 2007).

Estadio conclamado: Ya hay síntomas típicos relacionada a las 4 dimensiones sintomáticas, pero con variables grados de afectación a lo largo del tiempo (Mingote et al., 2007)

Estadio de remisión o estabilización: En el que la psicoterapia y la psicofarmacología pueden mejorar el bienestar personal y prevenir otros brotes de la enfermedad, que pueden durar varios años. Estos pacientes se mantienen asintomáticos o con síntomas no psicóticos (Mingote et al., 2007).

Estadio Terminal o irreversible: Cuando se presenta resistencia al tratamiento, es decir, cuando no hay una mejoría clínica significativa a dos o

más fármacos durante 6 o más semanas a dosis terapéuticas adecuadas (Mingote et al., 2007).

Epidemiología

La SQZ afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo. Es más frecuente en hombres que en mujeres, afectando a 12 y 9 millones respectivamente. Asimismo, los hombres la desarrollan generalmente a una edad más temprana. (OMS, 2018)

Según la magnitud e impacto que otorga la organización mundial de la salud las personas con SQZ tienen entre 2 y 2,5 veces más probabilidades de morir a una edad temprana que el conjunto de la población. Esto se debe por lo general a enfermedades físicas, como enfermedades cardiovasculares, metabólicas e infecciosas.

En Chile, la SQZ tiene una prevalencia de vida del 1,02 % en la población general y el 0,51% de las personas refiere síntomas de la enfermedad. (Minsal,2009)

Costos asociados

Según el informe de la Organización Mundial de la Salud y el Ministerio de Salud de Chile, el año 2007 el sector público destinó 2,14% del presupuesto total de salud a salud mental. En el año 2012, el porcentaje del presupuesto de salud que el sector público destinó a salud mental fue de 2,16%, cifra que está muy debajo de 5% que propuso como meta el Plan Nacional de Salud Mental y Psiquiatría para el año 2010 (Errazuriz y cols, 2015)

Fisiopatología

Hasta el momento se desconoce el mecanismo neurobiológico exacto que subyace a la SQZ, por lo que se han desarrollado distintas hipótesis a lo largo del tiempo (Saiz, De la Vega, Sánchez., 2010)

Hipótesis del Neurodesarrollo

Postula que el trastorno es producto de una alteración producida durante el periodo del neurodesarrollo y cuyo origen sería genético, ambiental o por una combinación de ambos. Dicha lesión temprana interactuaría con el proceso de maduración normal del cerebro, sobre todo en áreas corticales, que llevarían a un control cortical deficiente de la actividad dopaminérgica subcortical y el estrés lo que haría sería sensibilizar este sistema, para en algún momento producir el episodio psicótico (Stephan et al., 2006).

Hipótesis Dopaminérgica

Esta hipótesis sostiene que los síntomas de la SQZ se deben a un exceso de dopamina o a una elevada sensibilidad a este neurotransmisor (Matthyse, 1974).

También se asociaría a una desregulación en la transmisión dopaminérgica, por un lado, se observaría una hiperfunción dopaminérgica subcortical en las proyecciones mesolímbicas, que resultaría en la hiperestimulación de los receptores D2 con aparición de síntomas positivos. Y, por otro lado, una hipofunción en las proyecciones dopaminérgicas mesocorticales al córtex prefrontal, que resulta en la hipoestimulación de los receptores D1 con consecuente sintomatología negativa, afectiva y cognitiva. Sin embargo, las vías dopaminérgicas nigroestriada y tuberoinfundibular se mantienen relativamente preservadas (Davis et al., 1991; Laruelle et al., 2003).

Hipótesis Glutamatérgica

Los mecanismos propuestos para explicar la mediación del glutamato en la SQZ encuentran su fundamento en la neurotoxicidad inducida por resultado de una excesiva neurotransmisión excitadora glutamatérgica y su interacción con la dopamina (Coyle, 2006).

Se postula, además, que existe una hipoactividad de receptores NMDA, resultando en una hiperactividad dopaminérgica con aparición de sintomatología positiva (Javitt y Coyle, 2004). Asimismo, se observó que cuando los receptores NMDA son hipofuncionales encima de los síntomas positivos descritos aparecían síntomas negativos, cognitivos y afectivos (Coyle et al., 2003)

Hipótesis Serotoninérgica

La hipótesis que implica a la serotonina en la SQZ señala su interacción con el sistema dopaminérgico y los efectos de la serotonina en la corteza prefrontal a través de sus receptores 5HT2A (Kapur y Remington, 1996).

En los últimos años se ha sugerido un aumento del tono serotoninérgico central en los pacientes con SQZ (Abel et al., 1996; Monteleone et al., 1999). Diversos autores han sugerido que la sintomatología negativa de la SQZ reflejaría en parte, una hipofunción dopaminérgica en la corteza prefrontal, debida al efecto inhibidor que tendría la serotonina a ese nivel (Weinberger y Berman, 1988; Weinberger y Lipska, 1995; Davis et al., 1991).

Todas estas hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de la patogenia de la SQZ, tienen un componente común que inducen cambios fisiológicos que abarcan mecanismos de disfunción neuronal e inflamación, que involucra al EO. Sin embargo, no se conoce si este interviene como una causa primaria en el desarrollo de la SQZ, o si es un desbalance producido durante el curso de la enfermedad.

Estrés oxidativo (EO)

El EO es un desequilibrio entre los prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas. (Venereo., 2002)

Esto último puede estar provocado por un nivel aumentado de componentes endógenos y exógenos generando oxidación junto a la producción de especies

reactivas del oxígeno (ROS) agotamiento de antioxidantes de bajo peso molecular, inactivación de enzimas antioxidantes, descenso en la producción de enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular o combinaciones de 2 o más de las anteriormente señaladas (Lushchak, 2014)

Radicales libres (RL)

Los RL constituyen potentes agentes oxidantes, altamente reactivos ya que son moléculas que tienen un electrón desapareado o libre por lo que le otorga una especial reactividad, ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky., 2006).

Una vez que el RL ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un RL por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena capaz de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. (Avello y Suwalsky., 2006).

Estas moléculas radicalarias, poseen una vida media muy corta por lo cual se hace difícil su medición en las reacciones de oxidación con otras moléculas. A

su vez, producto de estas reacciones, los RL producen nuevas formas con diferente nivel de estabilidad y toxicidad (Fernández y Túnez-Fiñanac., 2009)

Como se señalaba, los RL son responsables de reacciones de oxidación y daño celular, más también cumplen una función fisiológica en el organismo participando en fagocitosis, síntesis de colágeno, respuesta inmune, mediando procesos inflamatorios, favoreciendo la quimiotaxis, apoptosis y vías de señalización (Avello y Suwalsky., 2006). El daño oxidativo que se genera a nivel de individuo no es menor, sin embargo, están presentes los sistemas de defensa antioxidantes quienes mantienen este equilibrio necesario entre prooxidantes y antioxidantes. (Venereo., 2002)

Formación de especies reactivas del Oxígeno (ROS)

En los organismos de metabolismo aeróbico las especies reactivas de mayor importancia son aquellas que se forman durante el metabolismo del oxígeno, y se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS). Es importante considerar que el término ROS incluye una variedad de radicales libres propiamente dichos y otros átomos o moléculas que no lo son, pero que se consideran ROS por su alta reactividad en el medio que les confiere (Fernández J. et al, 2009). Sin embargo, es importante señalar que también forman parte de mecanismos de señalización y de regulación. Tales como, procesos de reparación e

inflamación, inducción en la síntesis de antioxidantes, control de la migración celular, proliferación, sobrevivencia y apoptosis. (Marotte C. y col 2013).

La formación ROS está directamente relacionada con los fenómenos de óxido-reducción. A continuación, se describen los mecanismos fundamentales de formación de ROS, que están dados a partir de la reducción univalente de la molécula de oxígeno (O_2) y que promueven la oxidación de otras moléculas. (Tabla 2)

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ se forma por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno, dando como resultado una especie altamente reactiva con el poder suficiente para generar oxidación lipídica, peroxidación y daño en el ADN (Fernández J. et al., 2009).

Las moléculas de $O_2^{\cdot-}$ pueden sufrir un proceso de dismutación (óxido-reducción) en presencia de iones de H^+ determinando la formación de oxígeno y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Fernández J. et al., 2009).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La molécula de H_2O_2 es un compuesto no radical perteneciente al grupo de las ROS debido a que puede generar fácilmente otros RL e inducir reacciones oxidativas en cadena. (Fernández J. et al, 2009).

Radical hidroxilo (OH^\cdot)

Aunque no tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares, posee un alto poder oxidante capaz de provocar peroxidación lipídica y daño oxidativo a las proteínas. Debido a su alta reactividad ocasiona daño molecular en el propio sitio donde se genera.

La coexistencia de O_2^\cdot y H_2O_2 determina la formación del radical hidroxilo a través de la denominada reacción de Haber Weiss. En reacciones catalizadas por metales, como la reacción de Fenton, el H_2O_2 se descompone en un ion OH^- , que es inofensivo, y un radical OH^\cdot , el más reactivo y tóxico de las ROS (Fernández J. et al, 2009).

Tabla 2: Especies reactivas de oxígeno y su formación

Especie reactiva del oxígeno	Formación
Anión superóxido	$O_2 + e^- = O_2^{\cdot -}$
Peróxido de hidrogeno	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \xrightarrow{-2H^+} H_2O_2 + O_2$
Radical hidroxilo (Rx. de Haber Weiss)	$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} = OH^- + O_2 + OH^{\cdot}$
Radical hidroxilo (Rx. De Fenton)	$Fe_3^+ + O_2^{\cdot -} = Fe_2^+ + O_2$ $Fe_2^+ + H_2O_2 = Fe_3^+ + OH^- + OH^{\cdot}$

Formación de especies reactivas del Nitrógeno (RNS)

Óxido nítrico (NO)

El NO es sintetizado por enzimas específicas denominadas óxido nítrico sintetasas (NOS) a partir del aminoácido L-arginina. Las NOS convierten la L-arginina en NO y L-citrulina utilizando NADPH. Esta familia de enzimas se expresa de forma diferencial en múltiples tejidos y pueden clasificarse en: neuronal (NOS1), inducible (NOS2) predominante en condiciones inflamatorias y endotelial (NOS3) expresada en células del endotelio vascular (Benavides y Pinzon, 2008)

El NO tiene un papel fundamental la célula por su habilidad para activar la enzima guanilciclasa, resultando en la formación de cGMP. Desde un punto de vista REDOX, la síntesis excesiva de NO se asocia a estrés nitrosativo y a condiciones inflamatorias y neurodegenerativas tales como desmielinización, daño neuronal y pérdida oligodendrítica (Fernández J. et al, 2009).

Peroxinitrito (ONOO-)

El ONOO- es un agente altamente oxidante, capaz de provocar daños al ADN y la nitración de las proteínas. Además, una formación excesiva de este compuesto conduce no sólo a la depleción de grupos tioles, sino también a una reducción en la biodisponibilidad del NO. (Fernández J. et al, 2009) (Tabla3).

Tabla 3: Peroxinitrito y su formación

Especie reactiva del nitrógeno	Formación
Peroxinitrito	$O_2^{\bullet-} + NO = ONOO^-$

Fuentes de ROS Y RNS

Las fuentes de ROS y RNS están dadas por agentes exógenos o endógenas mayoritariamente a consecuencia del metabolismo celular, como la cadena de transporte mitocondrial, la NAD(P)H oxidasa de la membrana citoplasmática, citocromo P450 reductasa, etc. (Figura 1)

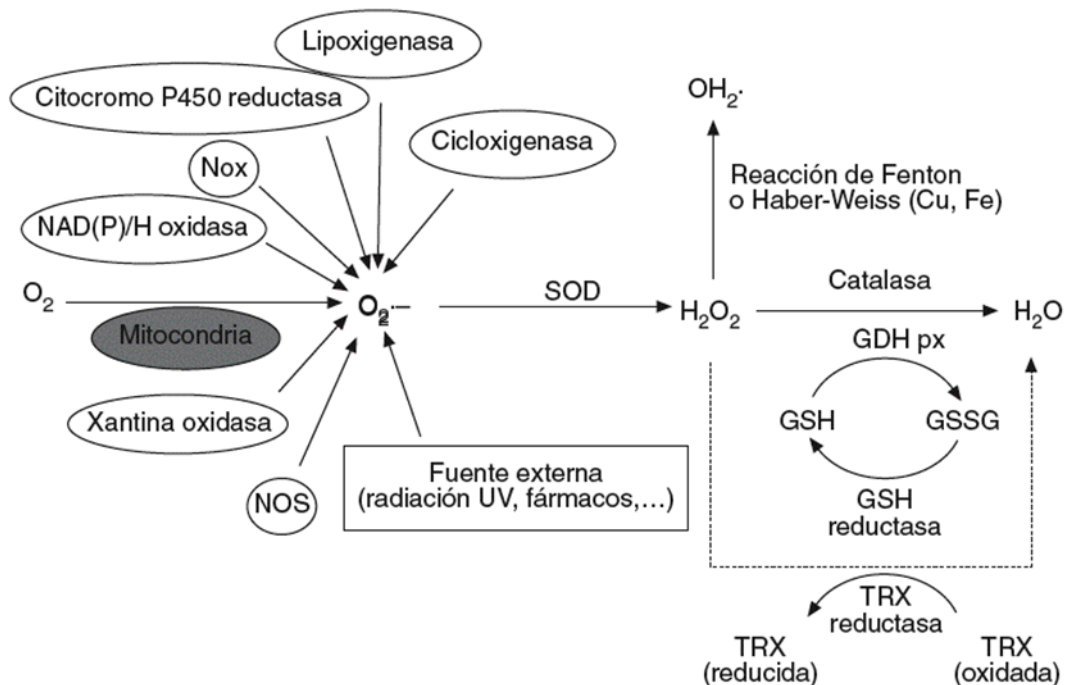


Figura1: Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH_2^{\bullet}), son generados en respuesta a agentes exógenos o, mayoritariamente, por vías endógenas del metabolismo celular, como la cadena de transporte mitocondrial, la NAD(P)H oxidasa de la membrana citoplasmática, la citocromo P450 reductasa, etc (Vaquero et al., 2005).

Sistema de defensa antioxidante

Son un grupo de moléculas que retrasan o previenen la oxidación del sustrato oxidable los cuales actúan como eliminadores o Scavengers que al sacrificar su estructura evitan perjuicio a lípidos, proteínas y ADN (Halliwell, 2008). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar más rápido con las ROS que con el resto de las moléculas presentes (Venereo, 2002). Un desequilibrio entre la formación de ROS y el actuar de los mecanismos de defensa antioxidantes, en donde estos últimos se vean sobrepasados, va a provocar estrés oxidativo y con ello efectos dañinos sobre diversas estructuras celulares. (Figura 2)

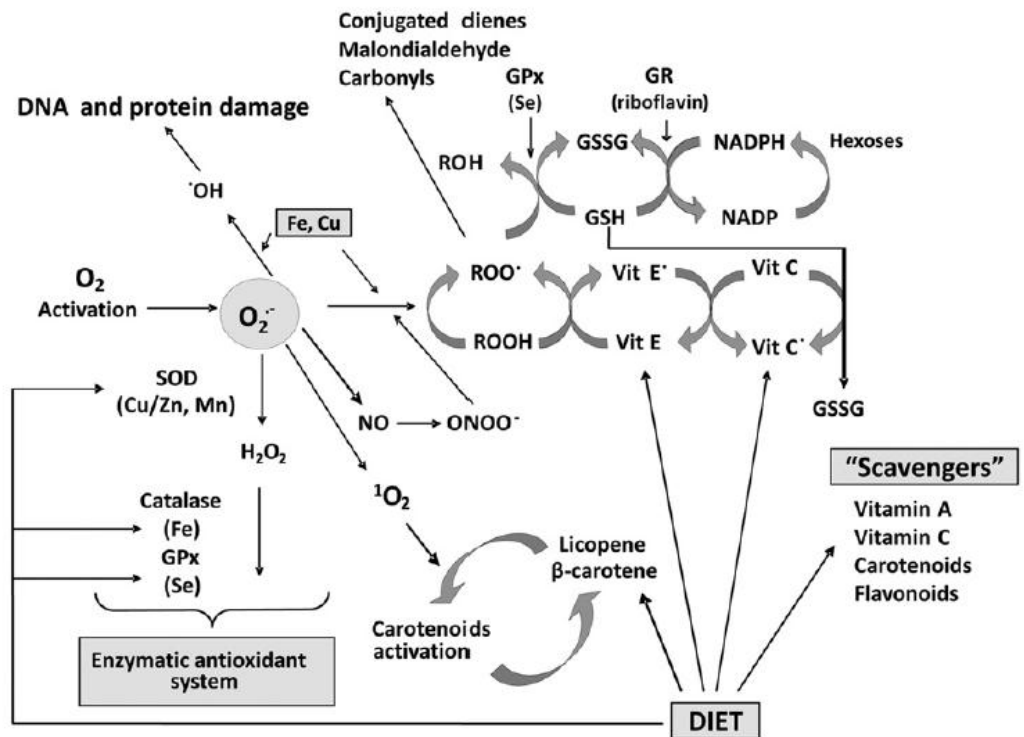


Figura 2: Interacción RL con mecanismos antioxidantes. El superóxido dismutasa (SOD) transforma el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y éste es degradado principalmente a agua (H_2O) por las enzimas glutatión peroxidasa (GSH px) y catalasa. Mediante la reacción de Fenton o Haber-Weiss, el H_2O_2 es capaz de formar OH^\bullet , un radical altamente reactivo.

El antioxidante al colisionar con el RL, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL (Oxilia, 2014)

De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no, los cuales según su origen se clasifican en endógenos (sintetizados por el organismo) y exógenos que vienen dados por la dieta. (Coronado y cols, 2015) (Figura 3)

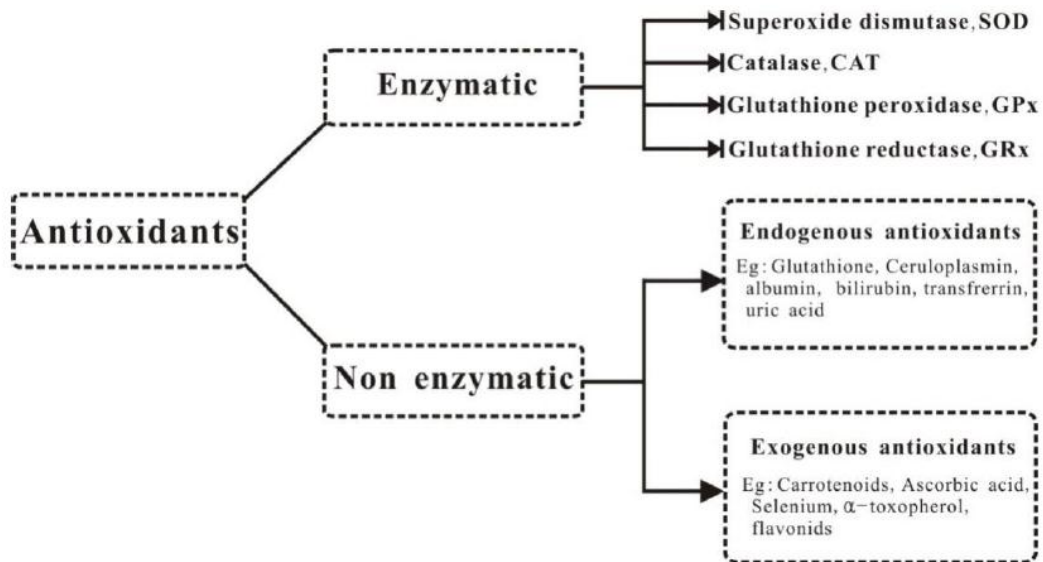


Figura 3: Clasificación de Antioxidantes Enzimáticos y no enzimáticos. Para contrarrestar el estrés oxidativo (EO) existen mecanismos enzimáticos tales como SOD, CAT, GPx y GRx o no enzimáticos a partir de sistemas antioxidantes endógenos o exógenos suministrado de la dieta. (Li et al., 2016)

Antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutasa (SOD)

SOD presenta dos isoformas que se clasifican según el ion metálico ligado a su sitio activo cobre (Cu), zinc (Zn) o magnesio (Mn). Tiene la facultad de eliminar $O_2^{\cdot -}$ y convertirlo en oxígeno y H_2O_2 . La SOD-Cu/Zn se encuentra mayoritariamente a nivel nuclear, citoplasmático y vascular. Mientras que

SOD/Mn esta principalmente en la matriz mitocondrial. A pesar de su acción, la SOD por sí sola no se considera un antioxidante como tal, debido a que produce H₂O₂, por lo que requiere de la acción de otras enzimas antioxidantes para descomponer a dicha molécula (Fernández J. et al, 2009).

Catalasa (CAT)

Es una hemoproteína de 4 subunidades, las cuales se encuentran en mayor concentración a nivel de los peroxisomas. Su rol principal es convertir el H₂O₂ en H₂O y O₂ (Fernández J. et al, 2009).

Sistema de glutatión peroxidasa/glutatión reductasa

El glutatión reductasa (GR) es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSS) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por el glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos. Se localizan a nivel del citosol, mitocondria y la membrana celular. (Fernández J. et al, 2009).

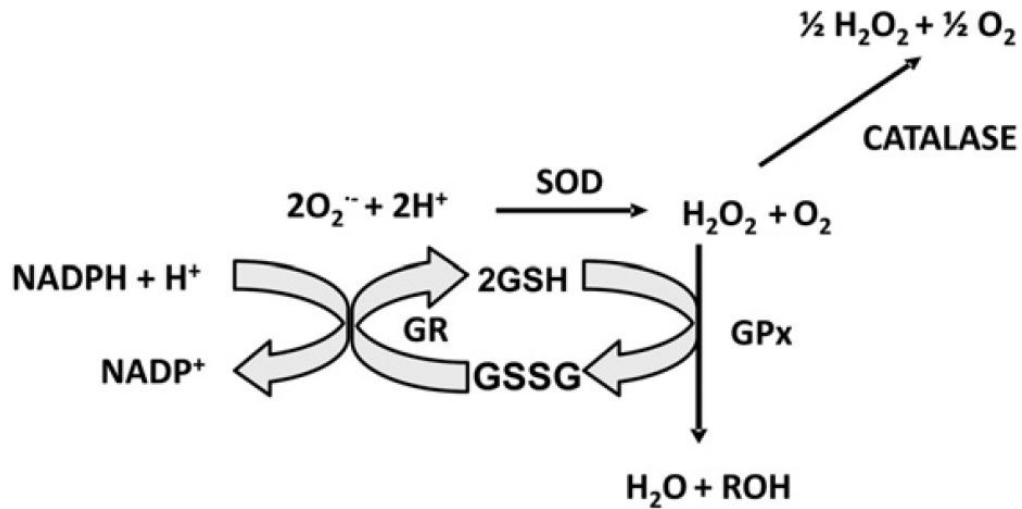


Figura 4: Sistema de defensa antioxidante enzimático. SOD dismuta el anión superóxido a peróxido de hidrogeno, este último luego es degradado por CAT y GPX a agua.

Antioxidantes no enzimáticos

Como se mencionó anteriormente, existen otros elementos no enzimáticos que cumplen la función de antioxidantes actuando a nivel intracelular, extracelular o en ambos compartimentos (Corrales, 2012) (Tabla 4)

Tabla 4: Antioxidantes enzimáticos endógenos y exógenos

Enzimáticos endógenos	Enzimáticos exógenos
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Ácido tióctico
Betacaroteno	Coenzima Q

Biomarcadores de estrés oxidativo

Los biomarcadores ofrecen información sobre parámetros medibles del daño a biomoléculas. El daño oxidativo de los lípidos se denomina lipoperoxidación (LP). Durante la LP se liberan numerosas moléculas que pueden ser consideradas como marcadores del proceso. El malondialdehído (MDA) es un aldehído producido durante la LP, que se ha utilizado comúnmente como marcador, a través de la metodología de las sustancias reactivas al ácido tiobartitúrico (TBARS). La prueba de ácido tiobartitúrico (TBA) se basa en la reactividad de TBA hacia MDA para producir un aducto rojo fluorescente de cromógeno intensamente coloreado (Ayala et al., 2014)

El glutatión reducido (GSH) por su parte constituye el componente tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos (Corrales & Muñoz, 2012). Tiene la capacidad de actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, el superóxido, hidroxilo y frente a especies reactivas del carbono. (Powers & Lennon, 1999)

Es sintetizado en las células, mediante la adición secuencial de cisteína a glutamato seguido de la adición de glicina. El grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína está involucrado en reacciones de reducción y conjugación que generalmente se consideran como las funciones más importantes de GSH. (Forman et al., 2009)

El mecanismo protector del GSH tiene como resultado la aparición de su forma oxidada, el glutatión disulfuro (GSSG). Así pues, una forma de evaluar el estrés oxidativo es determinando la relación entre GSH/GSSG (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La capacidad antioxidante total puede ofrecer una idea de cómo se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo en cada sistema. En el plasma, la capacidad plasmática antioxidante total depende preferentemente de la capacidad y cantidad de albúmina y de ácido úrico. Cuando se realiza en sangre total, la capacidad sanguínea antioxidante total, evalúa adicionalmente enzimas antioxidantes, glutatión y NADPH. La capacidad antioxidante total del eritrocito evalúa los sistemas eritrocitarios y no los plasmáticos. En las células se evalúa predominantemente los mecanismos antioxidantes enzimáticos, glutatión, NADPH y moléculas antioxidantes endógenas y exógenas; pero dependiendo de la célula y los orgánulos predominantes se podrá tener una participación mayoritaria de cierta actividad enzimática o de antioxidantes intracelulares. (Quintanar & Calderón, 2009)

Estrés oxidativo y esquizofrenia

A nivel cerebral existe una alta demanda de oxígeno para mantener la fosforilación oxidativa y generar la energía requerida para las funciones neuronales. Alrededor del 90% del oxígeno celular sirve como aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa. Sin embargo, algunos de ellos escapan de la cadena de transporte y reaccionar con oxígeno molecular, lo que conduce a la generación de oxi-radicales. (Bernardini y Vorst., 2008)

Además, el cerebro es rico en fosfolípidos, iones y metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{+}), y tiene un nivel relativamente bajo de enzimas antioxidantes. Todo esto hace del tejido nervioso extremadamente sensible a daño oxidativo causado por ROS y RNS. El mecanismo de estrés oxidativo de la SQZ no es completamente entendido, pero cada vez hay más evidencia que apoya la hipótesis del estrés oxidativo en la fisiopatología (Dong y Shaowen., 2017), sin embargo, no se conoce si este interviene como causa primaria en el desarrollo de la esquizofrenia, o si es un desbalance producido durante el curso de la enfermedad (Bernardini y Vorst., 2008).

Como factores implicados en EO y SQZ se han mencionado:

Factores genéticos que contribuyen a la modulación de la vulnerabilidad al estrés oxidativo en la SQZ, a este nivel se señala que existe una variación de ADN mitocondrial que afecta a la subunidad de reductasa de NADPH-ubiquinona (complejo1) componente de la cadena transportador de electrones, aumentando niveles de anión superóxido en SQZ. Factores ambientales tales como contaminación, exposición a tabaco, drogas genera variación en la expresión de estrés oxidativo. Hipofunción de receptores NMDA, que implica un exceso de glutamato a nivel extracelular, que genera neurotoxicidad, aumento de radicales libres o apoptosis. Anomalías en oligodendrocitos: Estrés oxidativo principalmente la disminución de GSH genera desmielinización de oligodendrocitos. Disfunción mitocondrial que conlleva a generación de ROS durante la fosforilación oxidativa, la diferencia de potencial REDOX entre $\text{NADH} + \text{H}^+$ y el O_2 , impulsa el transporte de protones desde los Complejos I, III, y IV hacia fuera de la matriz mitocondrial, los cuales son utilizados por la ATP sintasa para producir ATP a partir de ADP y Pi. Aun cuando este proceso pueda parecer bastante ordenado, desde los complejos I, II y III hay escape de electrones los cuales reaccionan con el O_2 formando O_2^- . (Bitanihirwe et al., 2010).

El mecanismo de estrés oxidativo de la SQZ no es completamente entendido, pero cada vez hay más evidencia que apoya la hipótesis del estrés oxidativo en la fisiopatología (Dong y Shaowen., 2017), sin embargo, no se conoce si este interviene como causa primaria en el desarrollo de la esquizofrenia, o si es un

desbalance producido durante el curso de la enfermedad (Bernardini y Vorst., 2008).

Evidencia de daño oxidativo en la esquizofrenia

Estudios clínicos

Varios estudios han documentado alteraciones en enzimas antioxidantes en la SQZ, pero esto no es siempre consistente mostrando niveles reducidos de enzimas antioxidantes en pacientes con SQZ comparados con control (Raffa et al., 2009), aumento (Kunnz et al., 2008) u otros reportaron cambios no significativos en evaluación de enzimas antioxidantes (Srivastava et al., 2001). Se señalo un aumento de actividad de SOD (Zhang et al., 2003), luego el mismo autor evidencio una disminución (Zhang et al., 2010). Con respecto a CAT han indicado disminución (Reddy et al., 1991) un aumento (Herken et al., 2001), sin cambios significativos (Zhang et al., 2010).

En relación con los niveles de antioxidantes no enzimáticos en plasma, se ha informado que se encuentra significativamente disminuidos en esquizofrenia (Bitanihirwe et al., 2010)

Los productos de la peroxidación de lípidos en pacientes esquizofrénicos no tratados se encuentran elevados (De Oliveira et al., 2009).

Evidencia de tratamiento antioxidante en esquizofrenia

En la actualidad se ha evidenciado que la terapia que usa antioxidantes tiene el potencial de prevenir, retrasar, o mejorar trastornos neurológicos, incluida la SQZ (Seybolt, 2010)

Por ejemplo, la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados como omega-3 en combinación con ácido ascórbico y tocoferol es eficaz en la mejoría de la psicopatología del paciente esquizofrénico medicado crónico (Arvindakshan et al., 2003). Del mismo modo, se ha informado que el tratamiento con extracto de Ginkgo biloba mejora la efectividad del antipsicótico y reduce algunos efectos secundarios extrapiramidales (Zhang et al., 2001b). También se ha demostrado que la medicación antipsicótica atípica con ácido ascórbico, tocoferol (Michael et al., 2002), y ácido lipoico (Kim et al., 2008) mejora el resultado clínico de pacientes con esquizofrenia.

Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con NAC mejora los síntomas centrales de la esquizofrenia (Lavoie et al., 2008; Bulut et al., 2009).

Y

se ha sugerido que NAC podría aumentar niveles de GSH en pacientes con esquizofrenia (Lavoie et al., 2008), mejorando así el funcionamiento de recepción de NMDA.

Modelos animales en esquizofrenia

La creación de modelos animales en psiquiatría tiene sus limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal, conductas humanas muy complejas. A pesar de todo, se utilizan para comprender las bases biológicas de las enfermedades y estudiar nuevos tratamientos (Genis y López, 2011).

Modelo Ketamina

Es uno de los modelos de administración de fármacos más usados. La Ketamina bloquea a los receptores NMDA estimulando la liberación de dopamina, activando así la vía mesolímbica. La administración de estos fármacos en roedores produce una conducta de hiperlocomoción, mediada posiblemente por el exceso de dopamina, por lo que se relaciona a esta conducta con los síntomas psicóticos de la esquizofrenia (Borison, 1977)

Dado que la SQZ disminuye la calidad de vida, capacidades cognitivas y sociales del paciente. En los animales, principalmente en roedores, se estudia

la capacidad que tienen los sujetos experimentales de interactuar activamente con otros roedores de su misma especie utilizando la prueba de interacción social (Seillier y Giuffrida., 2009), mientras que la capacidad cognitiva de los roedores se mide utilizando pruebas de memoria y aprendizaje (Canuet et al., 2010) En las que se ha evidenciado una disminución de la interacción social y/o de los procesos de memoria y aprendizaje

En cuanto a la validez de constructo, la mayoría de los modelos farmacológicos se apoyan en la hipótesis dopaminérgica y en la función de los receptores involucrados en la patología. Sin embargo, hay escasa evidencia en el modelo de roedor con ketamina sobre los parámetros de estrés oxidativo inducido por el tratamiento.

Evidencia de estrés oxidativo en modelo roedor intervenido con ketamina

Una investigación realizada durante este año señaló que la intervención con ketamina causó un aumento significativo de MDA, al tiempo que disminuyó el óxido nítrico y las concentraciones de GSH en ratones tratados con ketamina (Abdel et al, 2018)

Otro estudio evidencio que los niveles de MDA, glutatión peroxidasa (GPx) y SOD se restablecieron mediante intervención con ketamina en rata, ellos

señalan que la ketamina exhibe efectos neuroprotectores al atenuar el estrés oxidativo (Liang et al ,2018).

Una investigación en donde se estudiaron los efectos del tratamiento con ketamina en el cerebro de ratas demostró que MDA aumento en ratas tratadas con ketamina. Además, que la actividad de SOD aumentó en las ratas de control que recibieron ketamina, y disminuyó en las ratas que recibieron solución salina o ketamina (Reus et al, 2015).

Una investigación en donde se administraron dosis subanestésicas de ketamina en el cerebro de ratas postulo que la ketamina disminuyó la actividad de SOD y CAT. También los datos presentados en este estudio demuestran que dosis de ketamina a 4 y 10 mg / kg aumentaron TBARS (De Oliveira et al, 2009).

HIPÓTESIS

Hay variación de biomarcadores de estrés oxidativo en tejido sanguíneo de ratón intervenido con ketamina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar perfil de estrés oxidativo en tejido sanguíneo en modelo roedor intervenido con ketamina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar parámetro de daño oxidativo (TBARS) en modelo roedor intervenido con ketamina

-Determinar parámetro de defensa antioxidante no enzimática (TRAP) en modelo roedor intervenido con ketamina

MATERIALES

Para determinación de Parámetros REDOX

Instrumentos de medición:

Espectrofotómetro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601.

Software Estadístico STATISTICA versión 7. Año 2002.

Equipos:

Balanza Analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2.

pHmetro. Marca JENCO, modelo 60.

Centrífuga Clínica. Marca HETTICH, modelo UNIVERSAL/K2S.

Placa Calefactora. Marca LabTech, modelo LMS – 1003.

Vórtex. Modelo 37600 Mixer.

Sonicador. Marca Elma, modelo TRANSSONIC 310.

Baño Termorregulado. Marca K, modelo YCW – 04M (11L).

Micropipeta. Marca GILSON (Volúmenes 1-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L y 1-5 mL).

Notebook. Marca Lenovo ideapad 100-14 IBY.

Software Microsoft Office Excel 365. Versión 15.0.4797.1003, 2013.

Reactivos para determinar parámetros REDOX

ABTS: 2,2'-azinobi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ABAP: 2,2'-azobis (2-amidinopropano)

Buffer de Lavado (PBS)

Cloruro de Sodio (NaCl)

Fosfato Sódico Dihidrogenado (NaH_2PO_4)

Hidróxido de Sodio (NaOH)

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

MÉTODO

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos estándares. La intervención del modelo con ketamina fue realizada en el Laboratorio de Plasticidad Neuronal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Todos los procedimientos con animales de experimentación se llevaron a cabo de acuerdo con el Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council de Estados Unidos (NRC, 2010).

Animales de Experimentación

Grupos de experimentación

Se utilizaron 30 ratones, este cálculo se realizó con la ecuación de recursos obtenida del Centro Nacional de Refinamiento, reemplazo y reducción de animales para la Investigación de Reino Unido. Los ratones pertenecían a la cepa C57BL/6 de 45 días de edad, De los cuales se consideraron tres grupos en donde las unidades experimentales son Control, Vehículo y modelo ketamina.

Los animales de experimentación eran pertenecientes al bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, las que fueron mantenidas a una

temperatura de 21 ± 3 °C, humedad relativa ambiental entre 30%-70%, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 (8AM-8PM) y acceso ad libitum a alimento (Animal Care Mouse Diet) y agua potable.

Los procedimientos fueron sometidos a certificación de bioética para manejo y uso de roedores de experimentación por el Comité institucional de bioética para la investigación con animales de experimentación (CIBICA). (ANEXO 1)

Generación de las unidades experimentales

Las unidades experimentales fueron divididas en tres grupos. Control (C): Ratones no intervenidos, de 45 días de edad; Vehículo (V): Ratones inyectados con NaCl 0.9% vía intraperitoneal (i.p) a ratones de 45 días de edad, durante 7 días y Ketamina (K): Ratones inyectados con una dosis única de ketamina (60 mg/Kg) vía i.p. a ratones de 45 días de edad, durante 7 días.

Modelo de roedor ketamina

Al finalizar los tratamientos al modelo Ketamina después de los 60 días se le hacen las pruebas conductuales (reconocimiento de objetos, open field, plus

maze e interacción social) para verificar el modelo de esquizofrenia. Los procedimientos para la obtención del modelo experimental ketamina se llevan a cabo por personal especializado pertenecientes al laboratorio de plasticidad neuronal, del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias UV.

Recolección de Muestras

Una vez verificado el modelo animal, los grupos de experimentación son sacrificados mediante decapitación. Para esto primero se aplica un anestésico inhalatorio volátil llamado isoflurano, se coloca al roedor en una cámara anestésica o receptáculo apropiado con una gasa o algodón empapado en anestésico, cuando se duerme se realiza la decapitación, luego se deja caer la sangre mediante un embudo de vidrio a un tubo de heparina para la evaluación de los parámetros REDOX. El resto del animal es derivado a la obtención de tejidos para estudios paralelos a cargo del laboratorio de plasticidad neuronal.

Variables medidas

Tabla 5: Variables del Estudio

Variable	Tipo de variable	Definición	Dimensiones	Indicadores
Grupos	Independiente	Tratamientos	Grupo Control Grupo Vehículo Grupo Ketamina	30 ratones
TBARS	Dependiente	Prueba que mide daño a lípidos.	Concentración de MDA	nM MDA/mL
TRAP	Dependiente	Prueba que mide capacidad antioxidante total.	Concentración equivalente Trolox.®	TEAC μ M

Determinación de Biomarcadores REDOX

Posteriormente a la extracción de sangre de cada grupo de estudio, fueron llevadas al Laboratorio de Investigación de Estrés Oxidativo de la Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso, donde se analizará, parámetros oxidativos de daño a través de la prueba TBARS y de defensa no enzimática (TRAP).

Análisis de Biomarcadores REDOX

Protocolo separación de sangre

La sangre recolectada se sometió a un proceso de centrifugación durante 15 minutos a 3000 r.p.m. a 4 °C, una vez finalizado este proceso se obtendrán tres fases en la muestra: plasma, glóbulos blancos y glóbulos rojos (Gr). De la fase plasmática se almacenaron en tubo eppendorf a -20°C para la prueba TRAP. El material restante de sobrenadante, células blancas y plasma, serán eliminados. Luego, con el fin de obtener Gr limpios, se administrará a cada muestra un buffer de lavado fosfato salino a pH: 7.4, las cuales nuevamente serán

centrifugados durante 15 minutos a 3000 r.p.m; este procedimiento será repetido tres veces, desechando en cada oportunidad el sobrenadante. Finalmente, para la prueba TBARS se extraerán GR en tubo eppendorf, prueba que deberá realizarse inmediatamente.

Determinación de Daño Oxidativo

Protocolo Lipoperoxidación TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Basado en el método Estarbauer y cols. (1987). El pelet extraído desde la centrifugación de las muestras sanguíneas es tratado con ácido tricloroacético al 30% y centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm para precipitar y eliminar proteínas. Luego 600uL del líquido sobrenadante se mezcla con ácido tiobarbitúrico al 0,67% (p/v), reaccionando con los aldehídos de la muestra. Las muestras deben ser sometidas a un baño termorregulado a 100°C durante 20 min, luego se detiene la reacción bajo un baño frío. Finalmente se registra la absorbancia, mediante el método de espectrometría con un barrido entre 400-600 nm, para determinar la concentración de MDA mediante extrapolación de datos en base a una curva de calibrado.

Determinación de Defensa Antioxidante:

Protocolo para Capacidad antioxidante total TRAP (Total Reactive Antioxidant Properties)

Basado en el método Romay, 1996. Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS•+, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. Se realiza un buffer o también denominada solución PBS compuesta por 3 sales (NaCl, Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄) ajustado a pH 7.4, luego con 150mM del reactivo ABTS, y 10mM de ABAB (AAPH) se forma un radical estable. La mezcla de ABTS y ABAB en la solución PBS se incuba a 45 ° C durante 30 minutos, se detiene la reacción bajo un baño frío. La medición de la absorbancia se hará a 734nm en celdillas de cuarzo. La capacidad antioxidante total de los extractos será expresada en equivalentes mM Trolox™ (TEAC).

Análisis Estadístico

Mediante la determinación de los biomarcadores REDOX, se reportaron los datos, promedios y desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el software STATISTICA; donde los datos fueron sometidos a prueba de distribución de normalidad (paramétrica) de Pearson. En el caso de ser paramétrica, se realizó el análisis ANOVA y la prueba a posteriori de Tukey; en el caso de no paramétricos, se utilizó Kruskal-Wallis para múltiples muestras independientes. En cualquiera de los casos se utilizó un nivel de significancia de $p = 0,05$ (Zar, 1999). Cabe destacar que todas las pruebas fueron realizadas por triplicado para cada muestra.

RESULTADOS

El estudio se llevó a cabo en modelo roedor intervenido con ketamina, donde se realizó la determinación de parámetros REDOX en tejido sanguíneo, para las distintas condiciones se evaluó daño oxidativo (TBARS) y no enzimática (TRAP).

Daño oxidativo

Los resultados de lipoperoxidación que midió la oxidación de MDA, el cual es un residuo de la oxidación lipídica que se evalúa a través del ensayo TBARS y que extrapola daño oxidativo arrojó que el Modelo Ketamina (K) presento un promedio de nM MDA de 0,3935 (D.E: 0,19049), superando el promedio de 0,36175 (D.E: 0,19049) del Grupo Control (C) y de 0,3355 (D.E: 0,04916) del Vehículo (V). Siendo estas diferencias no significativas ($P=0.7451$) (Fig 5).

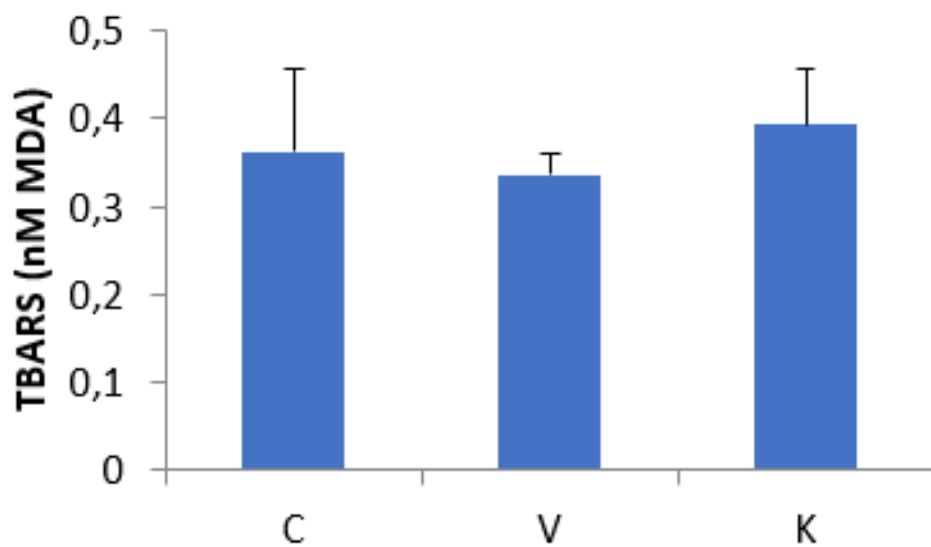


Figura 5: Lipoperoxidación en tejido sanguíneo (MDA nM).C: Grupo Control, V: Grupo Vehículo, K: Modelo ketamina. No indica diferencias significativas (p 0.7451 (n= 30; promedio \pm SD).

Capacidad antioxidante total

Se observó que la capacidad antioxidante total expresada en mM TEAC para el grupo control tuvo un promedio de 0,161003236 (D.E: 0,0626599) siendo este el más bajo comparado con el modelo Ketamina (K) 0,2620094 (D.E: 0,038603) y el vehículo (V) 0,239329 (D.E: 0,0407272). Siendo estas diferencias significativas del grupo control (C) comparada con el vehículo y modelo ketamina ($p= 0,000034$). (Fig. 6)

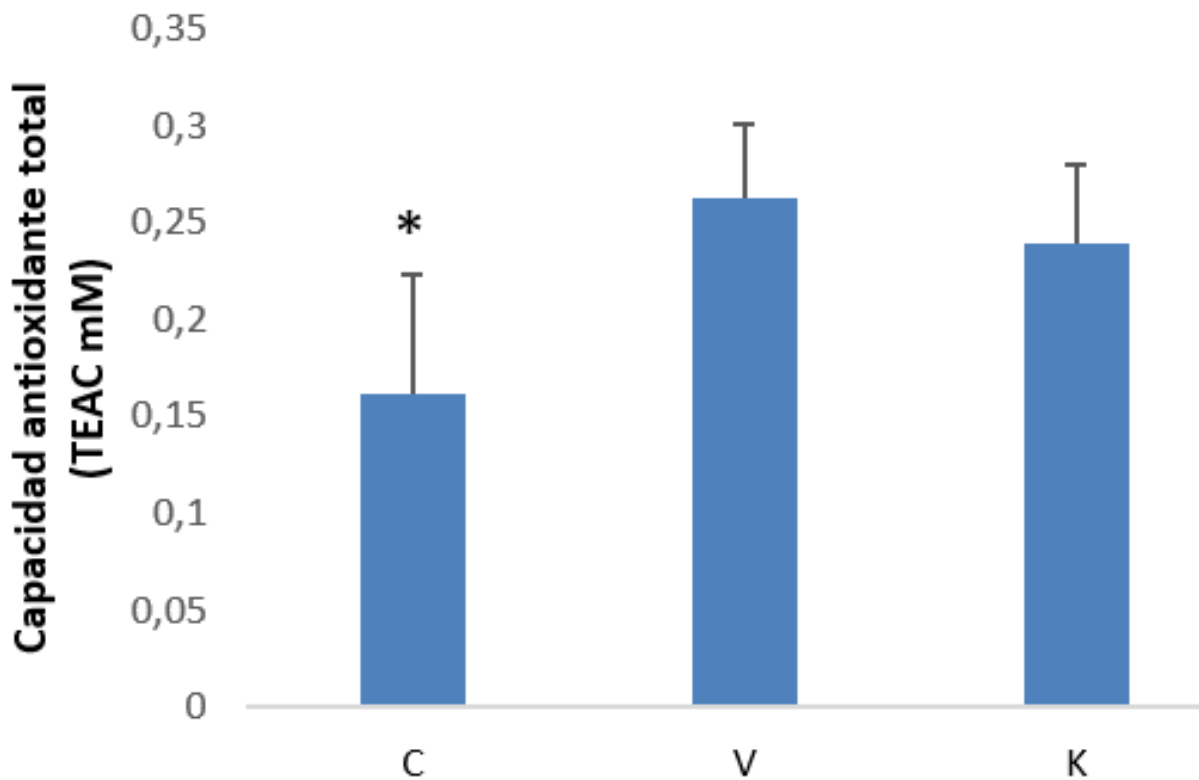


Figura 6: Capacidad antioxidante total medida en TEAC μ M (capacidad antioxidante equivalente a trolox). C: Grupo Control, V: Grupo Vehículo, K: Modelo ketamina. Indica diferencias significativas ($p: 0,000034$ ($n= 30$; promedio \pm SD)).

DISCUSIÓN

Como se señaló con anterioridad a nivel cerebral existe un alto consumo de oxígeno, rico en fosfolípidos, iones y metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{+}), y tiene un nivel relativamente bajo de enzimas antioxidantes. Todo esto hace del tejido nervioso extremadamente sensible a daño oxidativo causado por ROS y RNS.

El mecanismo de estrés oxidativo de la SQZ no es completamente entendido, pero cada vez hay más evidencia que apoya la hipótesis del estrés oxidativo en la fisiopatología (Dong y Shaowen., 2017), sin embargo, no se conoce si este interviene como causa primaria en el desarrollo de la esquizofrenia, o si es un desbalance producido durante el curso de la enfermedad (Bernardini y Vorst., 2008).

El empleo de modelos animales en investigación tiene claras limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano conductas humanas complejas. Sin embargo, permiten modelar algunos de los síntomas y características en la

enfermedad, condición que permite explorar las bases fisiopatológicas y explorar el potencial terapéutico de medicamentos específicos en el tratamiento de la sintomatología de esta patología (Genis et al., 2014)

Los resultados de esta investigación indican que los ratones intervenidos con Ketamina no presentaron diferencias significativas en los niveles de MDA. esto pone en evidencia que los resultados de TBARS obtenidos discrepan de la literatura. Al comparar con una investigación realizada durante este año que señalo que la intervención con ketamina causó un aumento significativo de MDA, en ratones tratados con ketamina (Abdel et al, 2018). Además de otro estudio realizado 2017 en donde se señaló que la intervención de ratones con ketamina aumentó los niveles de MDA (Onaolapo et al., 2017). Y otro en donde se administraron dosis subanestésicas de ketamina en el cerebro de ratas con dosis de en la cual se evidencio un aumento de TBARS (De Oliveira et al, 2009).

La discrepancia de los resultados de lipoperoxidación puede estar dado debido a que TBARS fue realizado en tejido sanguíneo, lo cual refleja el estado de EO a nivel de sistema y puede no reflejar lo que está ocurriendo con las reacciones REDOX a nivel de sistema nervioso central. A diferencia de los estudios anteriormente mencionados en donde las evaluaciones fueron realizadas en tejido cerebral. Otras de las diferencias entre estudios es la dosis de ketamina utilizada en ellas en donde se aplica ketamina mediante una inyección intraperitoneal de 30 mg/Kg durante 7 días (Abdel et al, 2018), de 15 mg/kg

durante 10 días (Onaolapo et al., 2017) y una dosis única de 4,10 y 30 mg/kg (De Oliveira et al, 2009).

Con respecto a la capacidad antioxidante total los resultados evidencian que los ratones intervenidos con ketamina presentan mayor capacidad antioxidante comparado con el control, lo cual discrepa de la única investigación en modelo símil de esquizofrenia inducido con ketamina realizado por Ahmed y colaboradores el presente año, cuyos resultados indican que la capacidad antioxidante total en modelo de rata intervenido con ketamina es significativamente menor al compararlo con el control. Estas discrepancias en los resultados podrían estar dados debido a la diferencia inter-especie, tejido evaluado y dosis de ketamina utilizada 25 mg/ kg durante 7 días (Ahmed et al., 2018).

CONCLUSIÓN

Los ratones intervenidos con 30 mg/kg de ketamina durante 7 días presentan niveles aumentados de la capacidad antioxidante total comparado con el grupo control.

Es preciso continuar con estudios de evaluación de parámetros de estrés oxidativo en este modelo dada la escasa evidencia actual en el modelo de ratón intervenido con ketamina en tejido sanguíneo y nervioso. Esto para contribuir al conocimiento de la fisiopatología y a la validación de modelo ketamina símil a esquizofrenia en ratón.

REFERENCIAS

Abdel-Salam, O., El-Shamarka, M., & Omara, E. (2018). Brain Oxidative Stress and Neurodegeneration in the Ketamine Model of Schizophrenia during Antipsychotic Treatment: Effects of N-Acetylcysteine Treatment. *Reactive Oxygen Species* , 6 (16), 253–266.

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*.

Bitanhirwe, B. K., & Woo, T. U. W. (2011). Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 878-893.

Chirino, Y. I., Orozco-Ibarra, M., & Pedraza-Chaverrí, J. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de investigación clínica*, 58(4), 350-358.

Codoñer-Franch, et all 2011)Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., Arilla-Codoñer, A., & Alonso-Iglesias, E. (2011). Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*, 158(6), 369-384

Cohen, S. M., Tsien, R. W., Goff, D. C., & Halassa, M. M. (2015). The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophrenia research*, 167(1), 98-107.

De Oliveira, L., Spiazzi, C. M. D. S., Bortolin, T., Canever, L., Petronilho, F., Mina, F. G., ... & Zugno, A. I. (2009). Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(6), 1003-1008.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 51(1), 7-62.

Fernández, J. M., Da Silva-Grigoletto, M. E., & Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Revista andaluza de medicina del deporte*, 2(1).

Genis-Mendoza, A. D., Beltrán-Villalobos, I., & Nicolini-Sánchez, H. (2014). Evaluación conductual del fenotipo «esquizofrenia» en un modelo animal por lesión neonatal del hipocampo ventral en ratas juveniles y adultas. *Gaceta Médica de México*, 150(5), 420-431.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959-975.

Greene, R. (2001). Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus*, 11(5), 569-577.

González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1).

Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 8(21), 2003.

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience*, 5(5), 405.

Herken, H., Uz, E., Özyurt, H., Söğüt, S., Virit, O., & Akyol, Ö. (2001). Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 6(1), 66.

Kotermanski, S. E., Johnson, J. W., & Thiels, E. (2013). Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 109, 67-76.

Li, J. K., Liu, X. D., Shen, L., Zeng, W. M., & Qiu, G. Z. (2016). Natural plant polyphenols for alleviating oxidative damage in man: Current status and future perspectives. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(5), 1089-1098.

Li, X. F., Zheng, Y. L., Xiu, M. H., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2011). Reduced plasma total antioxidant status in first-episode drug-naïve patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(4), 1064-1067.

Mahadik, S. P., & Mukherjee, S. (1996). Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophrenia research*, 19(1), 1-17.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-540.

National Collaborating Centre for Mental Health, & National Institute for Clinical Excellence (UK). (2002). *Schizophrenia: core interventions in the treatment and management of schizophrenia in primary and secondary care* (1).

Onaolapo, O. J., Ademakinwa, O. Q., Olalekan, T. O., & Onaolapo, A. Y. (2017). Ketamine-induced behavioural and brain oxidative changes in mice: an assessment of possible beneficial effects of zinc as mono- or adjunct therapy. *Psychopharmacology*, 234(18), 2707–2725.

Power S, Lennon S. (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.*; 58: 1025 – 1033.

Rumbaugh, G., & Vicini, S. (1999). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 10603-10610.

Saavedra, O. M., Vázquez, E. N. J., Vargas, M. R. B. G., Reyes, G. M. C., & Bolaina, E. M. (2010). Free radicals and their role in chronic-degenerative diseases. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 10(2), 32-39.

Soto-Bernardini, M. C., & Raventós-Vorst, H. (2008). The role of oxidative stress in schizophrenia. *Acta Médica Costarricense*, 50(4), 197-202.

Tamminga, C.A., Holcomb, H.H., 2005. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry* 10, 27–39.

Perälä, J., Suvisaari, J., Saarni, S. I., Kuoppasalmi, K., Isometsä, E., Pirkola, S., Härkänen, T. (2007). Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Archives of general psychiatry*, 64(1), 19-28.

Vaquero-Raya, E. C., & Molero-Richard, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas:¿ una posible diana terapéutica?. *Gastroenterología y hepatología*, 28(8), 473-484.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.

ANEXOS

Anexo 1: Comité de Bioética para la Investigación.

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA112-2017

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 2 de junio de 2017, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA112-2017 titulado "GABAergic neurotransmission is critical for controlling the prefrontal cortex spike timing dependent plasticity in schizophrenia", del investigador responsable Dr. Marco Fuenzalida N., de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Fondecyt 2017.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.




Chila Guisado Aránguiz
Presidente

Comité Institucional de Bioética para Investigación la Investigación con Animales de
Experimentación (CIBICA)

Valparaíso 5 de junio de 2017