

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“EVALUACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN *in vitro*, A TRAVÉS DE LAS REACCIONES DEL  
3-METIL-2-BENZOTIAZOLIDON HIDRAZONA (MBTH) Y DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO  
(TBARS).”**

**Bernardita Paz Contesse Bamón**

Memoria para optar al título de  
Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias Biológicas Animales.

Profesor Guía: Dr. Héctor Adarmes Ahumada

SANTIAGO – CHILE  
2010

## AGRADECIMIENTOS

Porque no hay plazo que no se cumpla.....

Quiero partir agradeciéndole a Dios por este momento tan placentero, que es el estar terminando mi memoria de título.

Termina un largo proceso que me ha dejado infinitos aprendizajes. Le agradezco a mi Universidad por haberme entregado tantos conocimientos y por enseñarme valores que creo fundamentales para la vida, como la perseverancia, la responsabilidad, la disciplina, la tolerancia a la frustración y la confianza en mis capacidades. Sin duda, que se anclaron en cada una de mis células

Infinitas gracias al Dr. Héctor Adarmes, mi profesor guía, que no solo fue fundamental para el desarrollo de este proyecto gracias a sus conocimientos, sino que también porque me llenó de alegría esos intensos días de laboratorio. Gracias al Dr. Galleguillos y a la Dra. Valenzuela por sus conocimientos y por su gran disposición a ayudarme siempre, son los tres grandes docentes. Gracias al Dr. Solís por su importante asesoría y muchísimas gracias al Sr. Víctor Molina, ya que sin él, este trabajo no habría existido. Le agradezco al, ya querido, Laboratorio de Bioquímica de la facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias por el ambiente ameno con el que siempre me acogió.

Le agradezco a mi hermosa familia, partiendo por mi amado esposo, Fran, que me ha apoyado en todo momento, me ha levantado cuando me han faltado las fuerzas para terminar este proyecto y ha aguantado estoicamente y siempre cariñoso mi mal humor en mis momentos más difíciles. Le agradezco a mis Tatas (Amaro y Piba), por su enorme apoyo, por interesarse y enorgullecerse con mi trabajo en cada momento, me hace inmensamente feliz que vivan este proceso conmigo. Gracias Rodrigo por tus sabios consejos, creo que no te imaginas todo lo que me ayudaron. Le agradezco a mi padre por haber priorizado siempre en mi educación, porque a pesar de que en este camino han habido momentos complicados su principal preocupación siempre ha sido educarnos de la mejor manera posible. Gracias padre, por tu perseverancia. Le agradezco a mi madre y a mis hermanos por estar presente en este proceso, cada uno a su manera apoyándome en todo, los siento siempre conmigo.

Le agradezco a cada uno de los que alguna vez me escuchó hablar de mi memoria de título, ya que sé que hicieron todo el esfuerzo posible por entender algo y apoyarme.

Gracias a la vida por este momento y por ser Médico Veterinario de la Universidad de Chile.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS .....	1
ÍNDICE GENERAL.....	2
ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS .....	3
RESUMEN .....	5
SUMMARY .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	30
DISCUSIÓN .....	43
CONCLUSIONES .....	47
ABREVIATURAS .....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

## ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

Figura 1	Generación de especies reactivas derivadas del oxígeno, cloro cloro y del nitrógeno	Pág. 10
Figura 2	Mecanismos de defensa contra los daños producidos por las ROS	Pág. 14
Figura 3	Esquema de distintos criterios de clasificación de los AO	Pág. 14
Figura 4	Esquema del daño producido por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas celulares	Pág. 16
Figura 5	Reacción de condensación del ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído	Pág. 17
Figura 6	Reacción involucrada en la metodología del MBTH	Pág. 19
Figura 7	Reacción catalizada por la enzima LDH	Pág. 23
Figura 8	Reacción catalizada por la enzima 5`- nucleotidasa	Pág. 24
Figura 9	Reacción de Haber-Weiss/Fenton	Pág. 25
Tabla 1	Protocolo de la metodología del MBTH para la determinación de grupos aldehídos en el LS	Pág. 26
Figura 10	Estructura de los aldehídos utilizados	Pág. 27
Figura 11	Protocolo para evaluar el posible efecto interferente de la glucosa con la metodología del MBTH y del TBARS	Pág. 28
Figura 12	Protocolo para evaluar el efecto AO del LS con la metodología del MBTH y del TBARS	Pág. 29
Tabla 2	Determinación de la actividad de la LDH	Pág. 30
Tabla 3	Determinación de la actividad de la 5`-nucleotidasa	Pág. 30
Figura 13	Distintos tiempos de incubación durante la generación de la LP microsómica <i>in vitro</i>	Pág. 31
Figura 14	Protocolo estandarizado para la generación de la LP microsómica <i>in vitro</i>	Pág. 32

Figura 15	Evaluación de la estandarización de la metodología del TBARS para la generación de la LP, inducida por el sistema $Fe^{3+}$ /Ascorbato	Pág. 33
Figura 16	Tiempo de estabilización de la reacción	Pág. 34
Figura 17	Absorbancia al utilizar distintas concentraciones de MBTH	Pág. 35
Figura 18	Protocolo estandarizado para la detección de los productos de la LP con la metodología del MBTH	Pág. 35
Figura 19	Evaluación de la estandarización de la metodología del MBTH para la generación de la LP, inducida por el sistema $Fe^{3+}$ /Ascorbato	Pág. 36
Figura 20	Reacción del TBARS y del MBTH con distintos aldehídos a partir de una concentración de $10^{-3}$ M	Pág. 37
Figura 21	Reacción del TBARS y del MBTH con distintos aldehídos a partir de una concentración de $10^{-2}$ M	Pág. 38
Figura 22	Reacción de TBARS con propionaldehído y glutaraldialdehído a partir de una concentración de $10^{-2}$ M	Pág. 39
Figura 23	Reacción del TBARS y del MBTH con glucosa $10^{-1}$ M, en presencia de la fracción microsomal	Pág. 40
Figura 24	Reacción del TBARS y del MBTH con distintos volúmenes de LS, en presencia de fracción microsomal	Pág. 41
Figura 25	Absorbancia con distintos volúmenes de LS, en presencia de fracción microsomal ([Proteína microsómica]: $100\mu\text{g/mL}$ )	Pág. 42

## RESUMEN

Durante el proceso de daño oxidativo, en la célula se alteran una serie de biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos. El daño oxidativo de los lípidos se denomina lipoperoxidación (LP), que afecta principalmente a los lípidos de membrana. Durante la LP se liberan numerosas moléculas que pueden ser consideradas como marcadoras 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 tiobarbitúrico (TBARS). Esta metodología presenta problemas de especificidad principalmente cuando se utiliza en fluidos biológicos y muestras de tejidos, por lo que en este trabajo se evaluó la metodología del 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona (MBTH) como una alternativa al TBARS en la determinación de los productos de la LP. Esto debido a que para el MBTH se ha descrito la capacidad de reaccionar con aldehídos presentes en el líquido sinovial (LS), cuyo origen se ha asociado a la degradación del colágeno II. Además se determinó el grado de especificidad reactiva de ambas metodologías evaluándolas en sistemas con distintos aldehídos (acetaldehído, propionaldehído, glutaraldehído y benzaldehído) y con glucosa (a una concentración de  $10^{-1}M$ ), ya que esta molécula presenta un grupo aldehído en su estructura. Finalmente, se evaluó el efecto antioxidante (AO) del LS con ambas metodologías. Todos estos ensayos se realizaron en un sistema biológico constituido por una fracción microsomal obtenida a partir de hígado de equino y se evaluaron espectrofotométricamente.

Se aplicó la metodología del TBARS a la fracción microsomal de hígado equino y se logró estandarizar la metodología del MBTH para la determinación de los productos de la LP *in vitro*. Al evaluar la especificidad reactiva de ambas metodologías con los distintos aldehídos, se encontró que el MBTH reaccionaba con los aldehídos a una menor concentración de lo que lo hacía el TBARS. Con la glucosa  $10^{-1}M$ , ni la metodología del MBTH ni la del TBARS generaron reacción colorimétrica, descartando, que bajo estas condiciones experimentales, la glucosa se comporte como un interferente de la reacción. Finalmente, el LS no manifestó su capacidad AO con ninguna de las metodologías utilizadas, incluso con el MBTH, al agregarle LS a la fracción de membrana se generó una curva ascendente proporcional a los volúmenes de LS adicionados.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que el MBTH sea más sensible a los productos de la LP que el TBARS, y que el cambio en el sistema biológico utilizado (de hígado de rata a hígado de equino) pudiera afectar en la capacidad AO del LS.

## SUMMARY

During the process of oxidative damage, the cell undergoes alterations in its carbohydrate, DNA, proteins and lipids. The process by which the lipids are damaged is called lipoperoxidation (LP), which occurs mainly on the membrane lipids. During this process numerous molecules are released. They can be considered as markers of the process. The malondialdehyde (MDA) is an aldehyde produced during LP, commonly used as a marker of the process, through the methodology of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). This methodology presents problems mainly when it is used in biological fluids and tissue samples, so in this work the methodology of 3-methyl-2-benzothiazolidon hydrazone (MBTH) was evaluated as an alternative to determine LP products. This is because the MBTH has been described as a method that reacts with aldehydes present in synovial fluid (SF), which is assumed to come from the degradation of collagen II. In addition, to determine the degree of specificity of both methodologies, they were evaluated with different aldehydes (acetaldehyde, propionaldehyde, benzaldehyde and glutaraldehyde) and glucose (at a concentration of  $10^{-1}$ M), since this molecule in its linear structure has one aldehyde group. Finally, in both methodologies, was evaluated the antioxidant (AO) effect of the SF. All these trials were conducted in a biological system formed by a microsomal fraction from equine liver and assessed by the colorimetric reaction that generated a specific wavelength for each methodology.

The methodology of TBARS was successfully implemented to equine liver microsomal fraction and the MBTH standardized as a methodology for determining the products of the LP *in vitro* was achieved. In assessing the reactive specificity of both methodologies, it appeared that the MBTH reacted with aldehydes to a lower concentration than the TBARS did. With glucose  $10^{-1}$ M, neither the MBTH method or the TBARS generated a colorimetric reaction. So, under these experimental conditions, glucose doesn't behave as an interfering reaction. Finally, the SF did not express its AO ability with any of the methodologies used, even with the MBTH an ascending curve was generated proportional to the volumes of LS added.

These results suggest the possibility that the MBTH is more sensitive to the LP products than the TBARS method, and the change made in the biological system (rat liver to equine liver) could have some effect on the AO ability of LS.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes hallazgos de la biología molecular, ha sido establecer el papel del oxígeno en los procesos biológicos. Se ha descubierto que esta molécula esencial para la vida de los organismos aeróbicos, tiene una elevada reactividad que la transforma en una molécula potencialmente tóxica, capaz de desencadenar diversas reacciones de óxido-reducción en los organismos. Este comportamiento dual del oxígeno es lo que se ha denominado *la paradoja del oxígeno* (Miller *et al.*, 1993), originando numerosas investigaciones que intentan describir los procesos en los que participa esta molécula.

El efecto del oxígeno sobre la actividad celular se asocia con los procesos oxidativos, que explicarían el envejecimiento celular, término asociado a la aceleración que puede producir el oxígeno en dicho proceso normal en todas las células.

Tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, se ha establecido que el daño oxidativo que produce el oxígeno está directamente relacionado con numerosas patologías de importancia en ambas disciplinas. Un ejemplo es el importante papel del estrés oxidativo en cuadros que afectan al bovino, como mastitis, problemas de fertilidad e hipocalcemia entre otras (López-Alonso *et al.*, 1997). El daño oxidativo se ha descrito también en las patologías de naturaleza inflamatoria que afectan a las articulaciones, encontrándose en el líquido sinovial (LS), un incremento de las proteínas carboniladas así como de productos de la lipoperoxidación (LP). Este último proceso se ha determinado tradicionalmente a través de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). También se ha utilizado con este fin la determinación de dienos conjugados y últimamente la concentración de isoprostanos.

Por otro lado, Sawicki *et al.* (1961), comenzó a utilizar la metodología denominada N-metil-benzotiazolidon hidrazona (MBTH), con el fin de detectar la presencia de aldehídos en la contaminación ambiental. Posteriormente esta metodología fue utilizada por Horvath *et al.* (1983), para determinar grupos aldehídos presentes en el LS de articulaciones dañadas, para describir tempranamente el daño articular. Finalmente, desde hace varios años, en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, se ha utilizado esta metodología con el fin de relacionar la concentración de aldehídos presentes en el LS con la degradación del colágeno tipo II del cartílago articular (Adames *et al.*, 2006).

Durante la LP de membranas plasmáticas se generan diversas especies, entre las cuales se encuentra el malondialdehído (MDA), no obstante, este no es el único aldehído producido durante



ese proceso (Janero, 1990), por lo que metodologías como el MBTH, que reaccionan con aldehídos, podrían reaccionar con dichas moléculas producidas durante la LP.

Los aldehídos no solo están presentes en estos procesos, sino que pueden ser parte de numerosas moléculas presentes en fluidos biológicos. Este es el caso de la glucosa, molécula presente en la mayoría de los líquidos biológicos (incluido el LS), que en su forma no piranósica expone un grupo aldehído. Se ha descrito que la metodología del TBARS, es muy útil cuando se utiliza en fracciones de membranas aisladas, como microsomas y liposomas, pero tiene problemas cuando se aplica a fluidos biológicos y a extractos de tejidos, ya que presenta interferencias con otras moléculas que se encuentran en estas muestras (Halliwell y Chirico, 1993). Por esto, se presenta la interrogante de si tanto la metodología del TBARS como la del MBTH, son específicas para ciertos aldehídos o moléculas que incluyan a este grupo en su conformación.

Para evaluar ambas metodologías, se sometió una fracción microsomal obtenida de hígado de equino a estrés oxidativo, a través del sistema  $Fe^{+3}$ /Ascorbato. Con el fin de evaluar el comportamiento de este modelo de LP *in vitro*, se utilizó LS al que se describió, previamente, un efecto antioxidante (AO) (Müller *et al.*, 2008).

Según los antecedentes presentados, en esta memoria de título se buscó, en primer lugar, estandarizar la metodología del MBTH para la determinación de los productos de la LP de membranas plasmáticas, en un sistema *in vitro*. Así, se intentó modificar la explicación de que el MBTH reacciona con aldehídos presentes en el LS, provenientes de la degradación de colágeno tipo II, incluyendo la posibilidad de que también pudiera reaccionar con aldehídos provenientes de la LP. En segundo lugar, se evaluó el posible papel interferente que puede tener la glucosa en ambas metodologías, como ejemplo de molécula que tiene en su estructura un grupo aldehído y que además se encuentra en la mayoría de los fluidos biológicos. Finalmente se evaluó el papel AO del LS tanto con la metodología del TBARS (donde ya se ha probado antes) como en la metodología del MBTH ya estandarizada para las nuevas condiciones experimentales.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

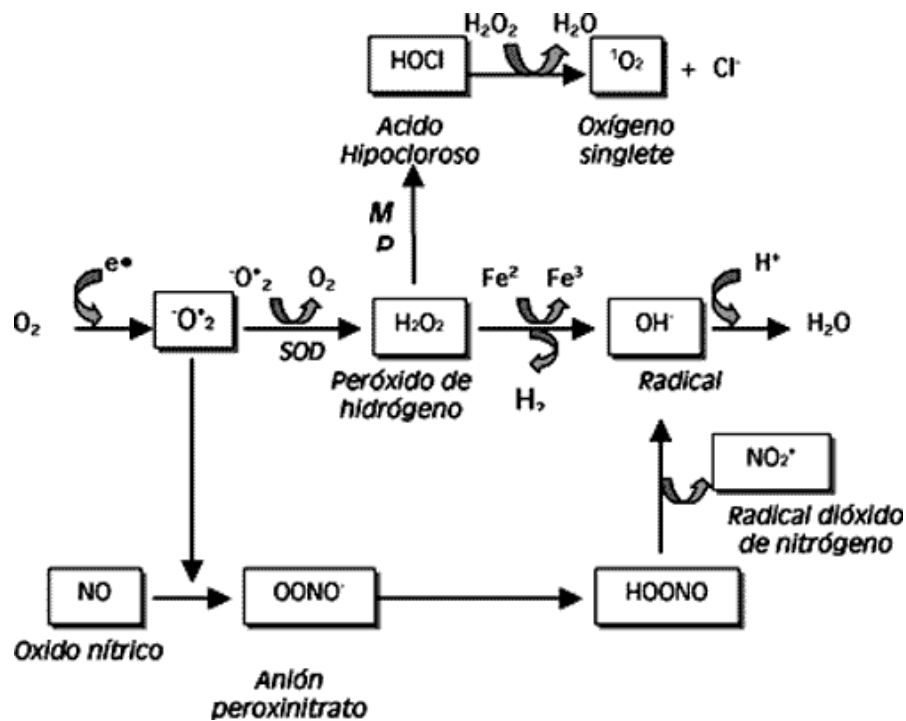
El envejecimiento celular es un proceso complejo que ocurre inevitablemente en todos los organismos, en los cuales, las células se van haciendo cada vez más susceptibles al estrés producido por el medio.

En el daño celular participa una gran variedad de moléculas de diferentes orígenes, que incluyen a las especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS), ya que todos los organismos aeróbicos dependen del O<sub>2</sub> atmosférico.

Dentro de las ROS se incluyen los radicales libres (RL), que corresponden a cualquier especie química que posea uno o más electrones desapareados en su orbital más externo. Esta configuración electroquímica es muy inestable, por lo que le otorga al radical la propiedad de ser una especie química altamente agresiva y de corta vida media (Chihuailaf *et al.*, 2001). Esta reactividad lleva a los RL a participar en diversas reacciones óxido-reducción de biomoléculas, produciendo así, daño en la célula e incluso muerte celular (Fang *et al.*, 2002).

No obstante, los RL también tienen funciones beneficiosas para el organismo, ya que están íntimamente relacionados a los procesos fisiológicos normales de los seres vivos. Por ejemplo, participan como mensajeros en diferentes procesos intracelulares, como la activación de factores de la transcripción durante la mitosis y la apoptosis celular (Winrow *et al.*, 1993; Valko *et al.*, 2007). También participan como intermediarios en diversos procesos homeostáticos esenciales para la vida, como es la destrucción de microorganismos, a través de la peroxidación y desestabilización de sus membranas plasmáticas, la síntesis de mediadores inflamatorios y la vasodilatación de vasos sanguíneos, entre otros (Kowaltowski y Vercesi., 1999; Chihuailaf *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2001).

Como se indica en la figura 1, la generación de ROS incluye una serie de reacciones donde participan moléculas como el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo (OH<sup>·</sup>), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ozono (O<sub>3</sub>). Otras moléculas que pueden participar en el envejecimiento celular son todas aquellas especies reactivas que derivan del nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico (NO<sup>·</sup>), el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), y el ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>); y las que derivan del cloro (RCS) que también poseen una alta reactividad, como es el ácido hipocloroso (HOCl). Finalmente, hay ciertos metales de transición que participan en el proceso oxidativo, como el Cu<sup>+</sup>, Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup>, entre otros. Estos metales pro-oxidantes son capaces de aumentar el proceso oxidativo, ya que transforman moléculas oxidantes en otras formas aún más reactivas (Roberfroid y Calderón., 1993).



**Figura 1: Generación de especies reactivas derivadas del oxígeno, cloro y del nitrógeno. MP: mieloperoxidasa; SOD: superóxido dismutasa.**

En general, las moléculas oxidantes pueden ser de origen exógeno o endógeno. La acción de las moléculas oxidantes de origen exógeno se relacionan directamente con su lugar de entrada al organismo. Por ejemplo, las moléculas oxidantes que ingresan por vía respiratoria originan estrés oxidativo que se ha asociado a la patogénesis de importantes patologías respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica del equino (EPOC) (Mudway y Kelly., 2000; Rahman., 2005).

Las moléculas oxidantes de origen endógeno se han dividido en tres grupos según su origen. Un grupo corresponde a aquellas moléculas oxidantes que se originan en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Kowaltowski y Vercesi., 1991). Un segundo grupo corresponde a las moléculas oxidantes que provienen de actividades enzimáticas, como es el caso de la xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa. El tercer grupo de moléculas oxidantes es producido en la respiración celular de las células inflamatorias, específicamente por la acción de la enzima NADPH-oxidasa, que a pesar de su naturaleza enzimática, se considera como un grupo aparte dada su importancia en los procesos inflamatorios (Moslen, 1994).

Cabe destacar que todos estos radicales están constantemente reaccionando con otras moléculas o están siendo removidos por sistemas biológicos. Estas reacciones tienden a generar otras moléculas, muchas veces más reactivas que las anteriores, perpetuándose el daño celular.

Normalmente los organismos aeróbicos poseen mecanismos protectores que limitan la acción nociva de los RL. Este sistema defensivo, denominado sistema AO, corresponde a un amplio conjunto de moléculas de distinto origen, que actúan como un sistema coordinado y balanceado que protege a los tejidos y a los fluidos corporales de la acción de ROS/RNS/RCS producidos fisiológicamente o como respuesta a infecciones, cuadros inflamatorios diversos o enfermedades (Evans y Halliwell, 2001).

Existen distintos criterios para clasificar a los AO, pero los más utilizados son los siguientes.

#### **Clasificación según su mecanismo de protección**

Los AO pueden ejercer su acción defensiva a través de tres mecanismos distintos. Algunos actúan previniendo la generación de moléculas oxidantes, principalmente a nivel de la cadena transportadora de electrones (Beckman y Ames., 1998). Otro grupo, que es el más importante cuantitativamente, ejerce su acción inactivando o transformando a estas especies reactivas en moléculas menos reactivas, capaces de reaccionar con otros AO generándose moléculas químicamente estables. Finalmente, otros AO son capaces de limitar el efecto nocivo de las moléculas oxidantes, ya que pueden romper o reparar proteínas oxidadas y pueden inactivar lípidos y material nuclear alterado, disminuyendo la propagación del daño (Cheeseman y Slater., 1993; Miller *et al.*, 1993).

#### **Clasificación según su naturaleza química**

Los AO se pueden clasificar en aquellos cuya naturaleza es enzimática y los de naturaleza no enzimática (Larkins., 1999; Chaudière y Ferrari-Iliou., 1999; Maxwell., 1995).

##### **a) AO de origen enzimático**

Al tener un origen enzimático, los requerimientos de este tipo de AO son regulados acorde a los requerimientos celulares, pudiendo ser inducidas, inhibidas o activadas por factores endógenos (Harris., 1992). Actúan catalizando la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los RL. Posteriormente los sustratos o agentes reductores utilizados se regeneran, por ejemplo a expensas del NADPH (producido en las diferentes vías metabólicas), para quedar nuevamente activos (Chaudière y Ferrari-Iliou., 1999).

Alguno de estos AO son:

- Superóxido dismutasa (SOD): metaloproteína, presente en las células aeróbicas y fluidos extracelulares. Su función es catalizar la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno (Bandyopadhyay *et al.*, 1999). Existen tres isoenzimas, dependiendo del metal que contenga: dos intracelulares (la Mn-SOD que se encuentra en la matriz mitocondrial y las isoformas predominantes Cu-SOD y Zn-SOD localizadas preferentemente en el citosol) (Chaudière y Ferrari-Iliou., 1999; Mondola *et al.*, 2000). La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Yu., 1994).

- Catalasa (CAT): hemoproteína que contiene cuatro grupos Hem en su estructura. Su función es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, cuando dicho peróxido se encuentra en altas concentraciones. Es principalmente intracelular, concentrándose principalmente en peroxisomas y mitocondrias (Céspedes *et al.*, 1996; Wang y Quinn., 1999).

- Glutación peroxidada (GSH-Px): selenoproteína presente en las células animales, más específicamente en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de la forma reducida del glutatión (GSH), cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, cuando dicho peróxido se encuentra en bajas concentraciones (Yu., 1994; Powers y Lennon., 1999). Se han descrito cuatro isoformas de esta enzima, donde la primera corresponde a GSH-Px celular o clásica que se encuentra presente en prácticamente todas las células. La segunda isoforma es la GSH-Px plasmática o extracelular. El tercer tipo es la GSH-Px fosfolípidos hidroperóxido, cuya función es proteger de la LP ya que es capaz de reducir hidroperóxidos de ácidos grasos, previniendo el daño oxidativo (Allan *et al.*, 1999; Arthur., 2000). El último tipo es la GSH-Px gastrointestinal cuya función se asocia principalmente a la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos (Holben y Smith., 1999).

Para la acción de estas enzimas se requiere de la participación de cofactores, como los elementos traza, particularmente el selenio (Se), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn).

#### **b) AO de origen no enzimático**

Constituyen un heterogéneo grupo de moléculas que capturan RL y donan un electrón con el fin de estabilizarlo. De esta forma se originan especies químicas menos nocivas para las células (Bandyopadhyay *et al.*, 1999).

Algunos de estos AO son:

- Vitamina C (Ascorbato): Reacciona directamente con los RL superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. También tiene un importante rol al regenerar a la vitamina E, ya que actúa

sobre el RL tocoferoxilo. Todo este proceso transforma al ascorbato en el RL deshidroascorbato, el cual vuelve a su forma nativa por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos (Halliwell *et al.*, 1992). En ciertas condiciones, como por ejemplo excesivas concentraciones de iones  $Fe^{+3}$  y  $Cu^{+2}$ , el ascorbato puede actuar como un potente pro-oxidante.

- Ácido úrico: su acción AO está basada en la capacidad de esta molécula para prevenir la oxidación de la vitamina C y la de la formación de complejos con los metales Fe y Cu (Miller *et al.*, 1993; Yu., 1994).

- Glutación: su forma reducida (GSH) constituye el componente tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos. Tiene la capacidad de actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, el superóxido, el hidroxilo y frente a especies reactivas del carbono. Además tiene la importante función de reducir al RL tocoferoxilo y deshidroascorbato para reconvertirlos en su forma original (Powers y Lennon., 1999).

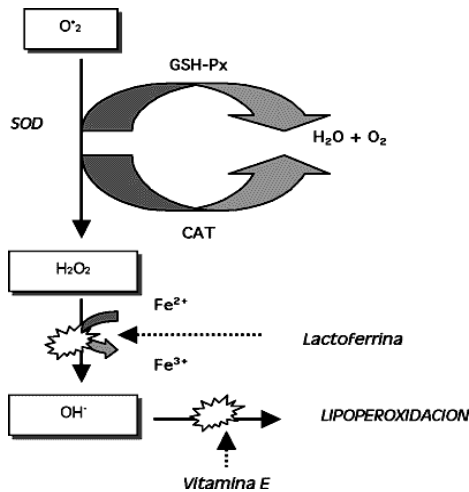
- Flavonoides polifenólicos: corresponde a un amplio grupo de compuestos fenólicos que actúan como quelantes de metales. Además se ha descrito, *in vitro*, que tienen la capacidad de capturar ROS y RNS.

- Vitamina E: molécula que tiene ocho isómeros estructurales de tocoferol, donde el que tiene mayor poder AO es el  $\alpha$ -Tocoferol. Su función AO se basa en su capacidad de capturar RL superóxidos, hidroxilos y peróxidos lipídicos en las membranas celulares y subcelulares, deteniendo la propagación de la LP de membrana. Al estabilizar a un RL el tocoferol se convierte en el RL tocoferoxilo, el cual vuelve a su estado original gracias a la acción de la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas A y C (Wang y Quinn, 1999).

- Vitamina A ( $\beta$  caroteno en los vegetales): protege de la LP producida por el sistema de la xantina oxidasa y elimina el ión superóxido y los radicales peroxilos. Bajo altas presiones parciales de oxígeno puede actuar como un factor prooxidante (comportamiento dual compartido con la vitamina C) (Yu., 1994; Morrissey y O'Brien., 1998).

- Ubiquinona o Coenzima Q: su forma reducida, el ubiquinol, impide que los ROS desencadenen la lipoperoxidación de membrana y además participa en el reciclaje de la vitamina E (Halliwell *et al.*, 1992; Powers y Lennon., 1999).

No obstante, independiente de su naturaleza química, los AO reaccionan en cadena de forma coordinada, formando un complejo mecanismo defensivo contra las especies reactivas (figura 2).

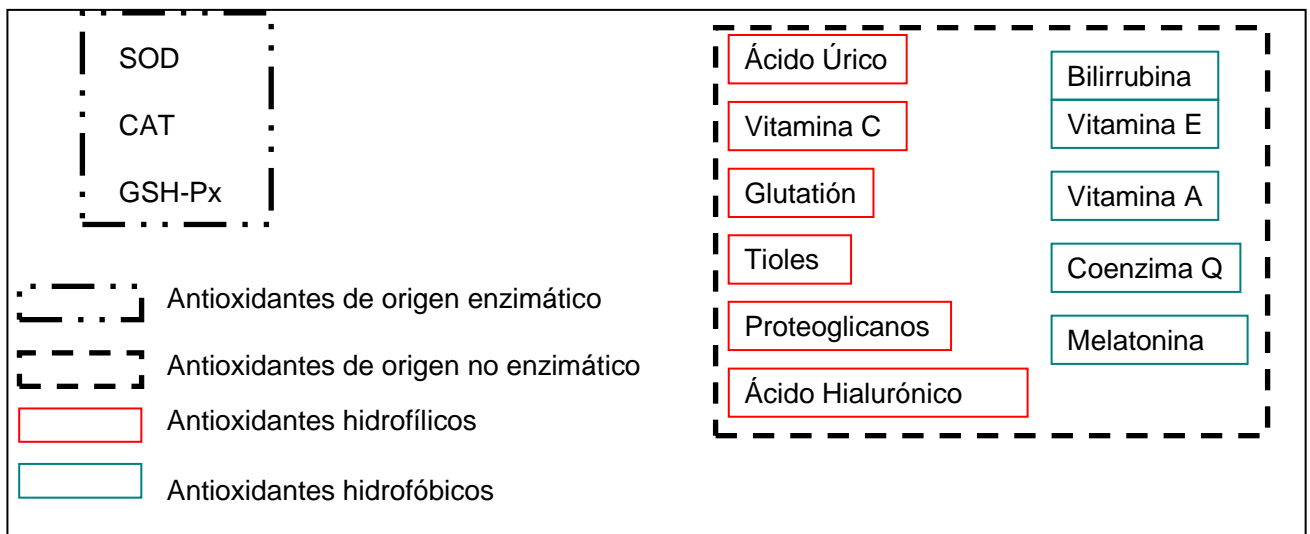


**Figura 2: Mecanismos de defensa contra los daños producidos por las ROS. La superóxido dismutasa (SOD) junto con la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GSH-Px) eliminan muchos de estos compuestos. La lactoferrina (que atrapa el hierro) u otros antioxidantes como la vitamina E, limitan los daños producidos.**

### Otros criterios de Clasificación

Existen otros criterios que se pueden utilizar para clasificar a los AO, como por ejemplo según su lugar de origen, clasificándolos en los AO de origen endógeno y los de origen exógeno; o según su relación con el agua, clasificándolos como hidrofílicos o hidrofóbicos.

Como se muestra en la figura 3, cada criterio de clasificación no es excluyente por lo que un mismo AO puede ser clasificado con más de uno de los criterios mencionados.



**Figura 3: Esquema de distintos criterios de clasificación de los AO.**

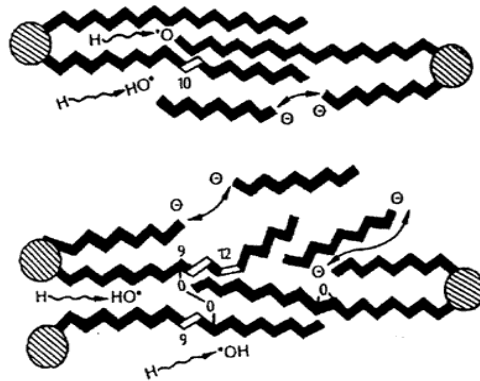
Normalmente, la producción de RL y el sistema AO se encuentran en equilibrio, pero existen numerosas causas que lo alteran, ya que o disminuyen la cantidad de AO o aumentan las moléculas pro oxidantes, generando un fenómeno llamado estrés oxidativo, que en definitiva corresponde al desequilibrio que ocurre a favor de las sustancias pro oxidantes (Sies,1991). Esta alteración es la que produce el daño celular, desencadenando trastornos fisiológicos y favoreciendo la presentación de procesos patológicos (Chihuailaf *et al.*, 2001).

Una vez que se ha desequilibrado el sistema hacia las moléculas pro-antioxidantes, cualquier componente celular se puede afectar por el daño oxidativo, pudiéndose oxidar el ADN, los lípidos, las proteínas y los carbohidratos celulares (Kirschvink *et al.*, 2007). Ahora bien, el orden exacto en que se afectan va a depender de factores como el origen, ubicación intracelular y propiedades químicas de las macromoléculas y de la reactividad de las moléculas oxidantes (Buettner, 1993).

La oxidación del ADN puede llevar a mutaciones y a rupturas de las hebras. La oxidación de las proteínas puede inducir a disfunciones enzimáticas, y finalmente la oxidación de los lípidos puede llevar a LP de las membranas plasmáticas iniciando una cadena de reacciones que pueden comprometer la integridad celular (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007). Existe controversia en relación al grado de susceptibilidad de los lípidos, ya que Halliwell y Chirico (1993) describen que los lípidos serían las últimas macromoléculas en afectarse, después del ADN y las proteínas, mientras que el mismo Halliwell (1997) describió que los lípidos son las macromoléculas más lábiles y se afectarían con mayor frecuencia.

Como se esquematiza en la figura 4, el daño oxidativo de los lípidos se inicia cuando un RL se une a un carbono metilénico de la cadena alquilo ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ ) de un ácido graso. Las cadenas de ácidos grasos afectadas, principalmente las poliinsaturadas (PUFA), se fragmentan en el carbono que se transforma en RL, desorganizando y destruyendo las estructuras fosfolipídicas de las membranas celulares (Duthie *et al.*, 1989; López-Alonso *et al.*, 1997; Duthie, 1999). Esto no sólo afecta directamente la funcionalidad de las membranas celulares, sino que también lo hace indirectamente ya que durante todo el proceso se producen metabolitos tóxicos como los aldehídos, entre los que se describen el MDA y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), hidrocarburos de cadena intermedia y peróxidos lipídicos que al degradarse originan nuevos RL (López-Alonso *et al.*, 1997).





**Figura 4. Esquema del daño producido por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas celulares. Los trazos negros representan enlaces saturados; los blancos insaturados; los círculos, las bases. Los radicales libres se fijan en diversos puntos de las cadenas, las desorganizan y las rompen.**

El daño oxidativo se puede medir de forma directa o indirecta.

### **I. Métodos directos**

Son metodologías que permiten medir la concentración de agentes oxidantes en la mezcla. Esto resulta muy difícil por la corta vida media que presentan las moléculas pro-oxidantes.

La única metodología utilizada con este fin es la espectrometría de la resonancia de la rotación (espín) de electrones. La aplicación de esta técnica presenta dos importantes limitantes, por un lado aún no es factible aplicarla en los seres vivos y por otro lado, los equipos necesarios para su implementación tienen un alto valor (Pérez y Pérez, 2000).

### **II. Métodos indirectos**

#### **• Determinación de los productos finales de la LP.**

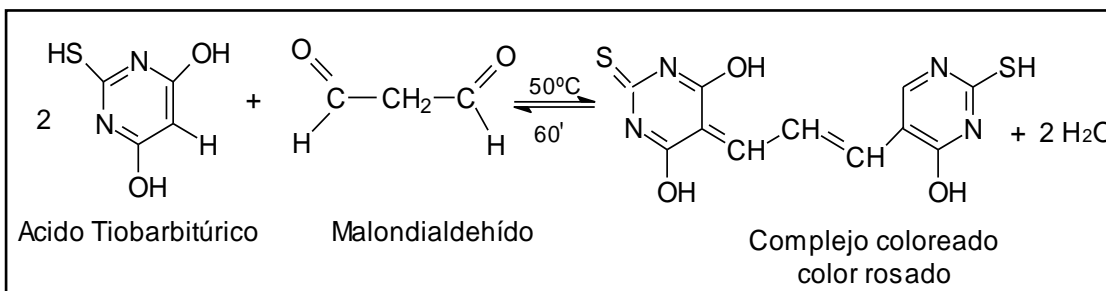
Durante la LP de membrana se genera una gran cantidad de metabolitos que pueden servir como marcadores del daño producido, a través de la utilización de metodologías que permitan cuantificarlos.

Algunas de estas metodologías son las siguientes:

#### **- Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA).**

El MDA es un aldehído de bajo peso molecular que se forma durante la descomposición de endoperóxidos en las últimas etapas de la LP (Valenzuela, 1991). La metodología del TBARS consiste en la reacción entre el MDA y el TBA. En un medio con pH ácido y a alta temperatura dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de MDA, formando un complejo coloreado en una

relación de 1:2 MDA:TBA, que puede ser medido fluorimétrica o colorimétricamente a 532nm (figura 5) (Janero, 1990; Halliwell y Chirico, 1993; Armstrong y Browne, 1995).



**Figura 5: Reacción de condensación del ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído.**

El TBARS es muy utilizado ya que es simple, económico y sensible, pero bajo ciertas condiciones presenta importantes problemas.

Esta metodología funciona bien cuando se utiliza en sistemas de membranas aislados (por ejemplo en microsomas o liposomas), pero cuando se aplica a fluidos biológicos y a extractos de tejidos presenta varios problemas relacionados principalmente con su inespecificidad. El TBA no es específico para el MDA que no es el único aldehído producido durante la LP ni es el único producto final de este mismo proceso. Por esta razón se ha descrito que, por ejemplo, materiales no lipídicos relacionados con la LP y otros aldehídos (distintos al MDA) producido en la descomposición de peróxidos lipídicos dan una reacción positiva con el TBA (Janero, 1990; Halliwell y Chirico, 1993). Por lo tanto, mientras mayor sea el contenido lipídico de la muestra biológica, se van a producir más metabolitos, que serán capaces de reaccionar con una cantidad fija de TBA, dando como reacción positiva a cualquier interacción entre el TBA y alguno de estos productos, sin poder especificar si se trata del complejo TBA-MDA buscado (Halliwell y Chirico, 1993).

El proceso de LP es acelerado por algunos metales de transición presentes en la mezcla (por ejemplo el Fe), por lo que puede ocurrir que en la reacción estén presente agentes quelantes, que inhiban la participación de estos metales, alterando la reacción. Finalmente, cuando se aplica la prueba del TBA a fluidos corporales muchas otras moléculas (como pigmentos biliares, glicoproteínas y carbohidratos como la desoxirribosa) dan reacción positiva con el TBA (Halliwell y Chirico, 1993).

Por la falta de especificidad de esta metodología es que se ha tratado de mejorarla o usar metodologías alternativas. Han habido aproximaciones, como la técnica propuesta por Halliwell y Chirico (1993), donde proponen que, en la metodología inicial, se incorpore un AO a la muestra antes de agregar el TBA, para evitar la propagación de la reacción a otros componentes lipídicos y

así intentar disminuir los falsos positivos. Junto con esto, proponen utilizar la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar el complejo TBA-MDA auténtico de otros cromógenos formados. De esta forma el HPLC elimina los productos de la reacción que puede ocurrir entre el TBA y otras moléculas constituyentes de los fluidos biológicos. A pesar de estas modificaciones, los mismos autores indican que no todos los falsos positivos son controlados por lo que la prueba del TBA sigue siendo poco específica.

Con todos estos antecedentes, se afirma que la prueba de TBARS solo se puede utilizar como una aproximación al estudio del complejo proceso de la LP de membranas plasmáticas, y no se puede utilizar como una reacción específica y determinante del proceso (Lefèvre *et al.*, 1998).

El uso y la interpretación de la prueba del TBARS para medir el MDA debe utilizarse con las restricciones descritas y debe ser correlacionada con otras metodologías que midan la LP.

- Medición de otros aldehídos procedentes de la LP.

El 4-hidroxinonenal (4-HNE) es otro aldehído producido durante la LP de membrana. Se puede medir con HPLC con detección UV o con cromatografía gaseosa (Halliwell y Chirico, 1993).

- Medición de hidrocarburos volátiles en el aire expirado.

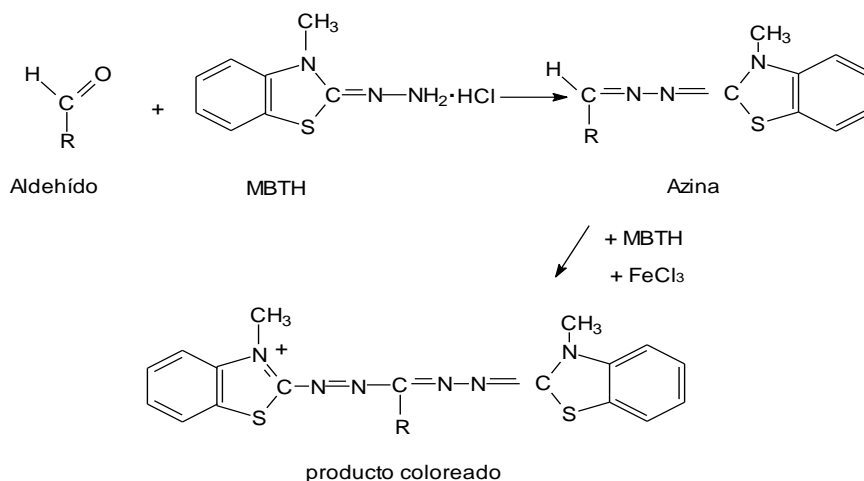
Principalmente etano y pentano, derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series omega-3 y omega-6 respectivamente. No es un método invasivo, pero es muy complicado por lo que es de difícil aplicación en seres vivos.

- Medición de compuestos fluorescentes de la LP.

Mide la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos, pero sólo es útil para etapas tardías de la peroxidación (Pérez y Pérez, 2000).

Existe otra metodología, que no ha sido aplicada para medir productos de LP, sino que se ha utilizado para medir aldehídos alifáticos hidrosolubles. Esta técnica se comenzó a utilizar para detectar y hacer una rápida estimación colorimétrica de los aldehídos presentes en el aire, con el fin de entender mejor el rol de los aldehídos alifáticos hidrosolubles en la contaminación ambiental (Sawicki *et al.*, 1961). Posteriormente, la necesidad de encontrar una técnica que fuera capaz de diagnosticar daño articular prematuro, antes que una radiografía o que la presencia de lesiones macroscópicas, llevó a Horvath *et al.* (1983), a utilizar esta técnica con el fin de evaluar la presencia de aldehídos en el LS de articulaciones alteradas. Esto, debido a que frente al daño articular se liberan colagenasas, que son capaces de degradar el colágeno II del cartílago articular, liberando grupos aldehídos al LS.

Esta metodología consiste en la reacción entre un aldehído y dos moléculas de MBTH en un proceso que ocurre en dos etapas. Como se esquematiza en la figura 6, la en la primera etapa, que ocurre a pH neutro, el carbono carbonilo del aldehído reacciona con el grupo hidrazina de una molécula de MBTH formando una azina incolora. La segunda etapa ocurre a pH ácido y bajo condiciones oxidantes, ya que en presencia de cloruro férrico, la azina reacciona con una segunda molécula de MBTH, formando un producto final coloreado, detectable en el rango visible del espectro (longitud de onda máxima 620 nm) (Anthon y Barrett, 2002; Sawicki *et al.*, 1961; Paz *et al.*, 1965).



**Figura. 6: Reacción involucrada en la metodología del MBTH (adaptado de Sawicki *et al.*, 1961)**

Los grupos aldehídos se pueden encontrar en distintas moléculas, como por ejemplo en azúcares reductoras, en el colágeno y la elastina (únicas dos proteínas que presentan el grupo aldehído en su estructura), entre otras. Además, en diversos procesos patológicos se pueden producir aldehídos como intermediarios o como productos finales, por lo que su cuantificación sirve como indicador de daño.

La metodología del MBTH ha sido probada con distintos propósitos, como por ejemplo por Anthon y Barrett (2002) con el fin de determinar la presencia de azúcares reductores o por Sawicki *et al* (1961) para determinar aldehídos contaminantes del aire, pero no se ha probado al MBTH como posible indicador del daño producido por la LP de membranas celulares.

Por estos antecedentes, en esta Memoria de Título, se pretende evaluar ambas metodologías en la determinación de los productos de la LP *in vitro*. Con este fin se utilizará una fracción microsomal de hígado equino como un sistema libre de colágeno. Además, se intentará modificar la

interpretación de la reacción del MBTH en el LS, ya que se le ha atribuido la determinación de la concentración de grupos aldehídos derivados de la degradación de colágeno tipo II del cartílago articular. Además, en ambos casos se evaluará si los resultados obtenidos se alteran debido a la adición de glucosa ya que esta molécula, presente en muchos fluidos biológicos, posee un grupo aldehído en su estructura.

Finalmente, se ha demostrado que el LS equino proveniente de articulaciones sanas y con daño crónico posee un efecto AO, al inhibir la LP *in vitro* (Müller, 2008). Este resultado se obtuvo a través de la técnica del TBARS. Por lo que en este trabajo se evaluará el efecto inhibitorio del LS sobre la LP a través de la metodología del MBTH.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la LP de una fracción enriquecida de membrana de hígado equino a través de las metodologías del MBTH y TBARS.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar el rendimiento del fraccionamiento subcelular a partir de hígado de equino, realizada para obtener una fracción enriquecida de membrana.
- 2) Implementar la LP *in vitro*, a partir de una fracción enriquecida de membrana de hígado equino.
- 3) Adaptar la metodología de la técnica del MBTH a la determinación de los productos de la LP *in vitro*.
- 4) Evaluar el posible efecto interferente de la glucosa sobre ambas metodologías.
- 5) Evaluar el efecto antioxidante del LS sobre la LP *in vitro*, utilizando ambas metodologías.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Reactivos**

Reactivos como fosfato dihidro de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), cloruro férrico, ácido tricloroacético (TCA), cloruro de potasio, cloruro de sodio, sulfato de cobre, tartrato de sodio y potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol, acetaldehído, glutaraldialdehído, propionaldehído y glucosa se obtuvieron del laboratorio Merck Chile. Otros reactivos como el ascorbato de sodio, el 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona (MBTH), el ácido tiobarbitúrico (TBA) y la albúmina de bovino fracción IV se obtuvieron del laboratorio Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

### **Material Biológico**

#### **Hígado de equino**

Se recolectaron 10 muestras de hígados sanos de equinos jóvenes, a partir de los lóbulos cuadrados, extrayendo aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes de cada lóbulo, que se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **Líquido Sinovial**

Se obtuvo LS por artrocéntesis aséptica de la articulación metacarpo falángica. Se seleccionaron articulaciones sanas a la inspección macroscópica (con membrana sinovial no congestiva y con cartílago blanco nacarado, entre otras consideraciones) (Müller, 2008) de equinos criollos del Matadero La Pintana. El LS se centrifugó a  $4.000 \text{ xg}$  durante 15 minutos (centrífuga Sorval Superspeed modelo RC2-B) y el sobrenadante (SN) se mantuvo como un solo grupo congelado a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### **Obtención de la fracción enriquecida de membrana de hígado de equino.**

Se descongeló un conjunto de 10 muestras de hígado de equino a temperatura ambiente. Estas muestras fueron lavadas con suero fisiológico (NaCl 0.9%), para después obtener 2 g de cada una de ellas, formando un total de 20 g. Este conjunto se lavó nuevamente con suero fisiológico (NaCl 0.9%) en una relación de 1:10 p/v. Posteriormente se procedió a trituración del conjunto de hígado para luego suspenderlo en los tubos de centrifuga con una solución de KCl 1,154 M en una proporción de 1:5, según lo descrito en Letelier *et al.* 2005. El conjunto obtenido fue homogeneizado 3 veces durante 30 segundos cada vez y con 15 segundos de descanso entre cada homogeneizada. Esto se realizó en un homogeneizador tipo Ultra Turrax. Todos los procedimientos mencionados se realizaron manteniendo las muestras en baño de hielo.

Luego, el homogeneizado fue sometido a centrifugaciones sucesivas. La primera a  $2000 \text{ xg}$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  en una centrífuga (Sorval Superspeed modelo RC2-B). Los

sobrenadantes (SN) se recuperaron formando un conjunto, del que se extrajo una alícuota de 3 ml que fue guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El resto del SN fue sometido a una segunda centrifugación a 10.000 xg durante 40 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , en la misma centrífuga y con los SN obtenidos, se siguió el mismo procedimiento anterior. El resto del SN fue sometido a una ultracentrifugación a 105.000 xg durante 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  en una ultracentrífuga (Ultracentrifuge Beckman modelo XL -90), en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Nuevamente se realizó el mismo procedimiento con los SN obtenidos, pero en este caso se removió el sedimento (que representan la fracción enriquecida de membrana) con amortiguador fosfato (50mM, pH=7,4) para luego homogeneizarlo y guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las alícuotas obtenidas de cada SN así como una alícuota del sedimento se utilizaron para estimar el rendimiento del fraccionamiento subcelular.

## **Métodos**

Para alcanzar los objetivos propuestos, se utilizaron las siguientes metodologías.

### **I. Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas de la fracción enriquecida de membrana, de los SN y del LS, se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Lowry *et al*, (1951). Se utilizó como estándar seroalbúmina de bovino (BSA), en un rango de concentraciones entre 12,5  $\mu\text{g}$  y 50  $\mu\text{g}$ . La concentración promedio de proteínas se expresó en mg/mL.

### **II. Rendimiento del fraccionamiento subcelular.**

Para evaluar el rendimiento del fraccionamiento subcelular, en cada una de las alícuotas, representativas de las distintas centrifugaciones, se midió la actividad de la enzima 5`nucleotidasa y de la lactato deshidrogenasa en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

#### **1. Lactato deshidrogenasa (LDH)**

La LDH es una oxidorreductasa que actúa al final de la glicólisis, específicamente en la conversión de lactato a piruvato de forma reversible, con la presencia de  $\text{NAD}^+$  como molécula aceptor de electrones (figura 7). De esta forma esta enzima se encuentra principalmente en el citoplasma, considerándose como una enzima marcadora del citosol (Bonner, 1955)



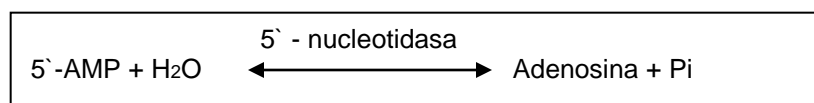
**Figura 7: Reacción catalizada por la enzima LDH.**



Para determinar la actividad de esta enzima citosólica, se siguió el protocolo descrito en Bonner, (1955). Este consistía en la utilización de una mezcla de 1 mL total formada por 0,943 ml de amortiguador fosfato (50mM, pH=7,4), 0,033 mL de solución de piruvato de sodio (7,6mM), 0,017mL de una solución de NADH (0,2 nM) y 0,007 mL de muestra. A esta mezcla se le determinó la absorbancia a 340 nm a distintos tiempos: 0, 1,2,3,4 y 5 minutos después de agregar la muestra respectiva.

## 2. 5`- Nucleotidasa

Las 5`- nucleotidasas son un grupo de enzimas que tienen distintos sustratos, diferente localización celular y amplia distribución filogenética. Se pueden encontrar en forma soluble en el citoplasma o unida a membrana a través de un puente glucosil fosfatidil inositol. Cada tipo tiene distintas funciones; las que se encuentran unidas a la membrana, tienen como función hidrolizar el ATP hasta adenosina, liberando el o los fosfatos (Lin y Russell, 1988).

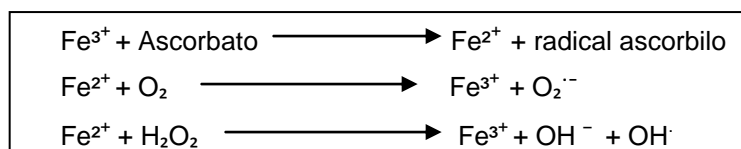


**Figura 8: Reacción catalizada por la enzima 5`nucleotidasa.**

Como esta enzima se encuentra presente en la membrana plasmática, se utiliza como marcador de membrana. Por esto, se procedió a la determinación de la actividad enzimática (figura 8) de la 5`-nucleotidasa en cada utilizando el protocolo descrito por Lin y Russell (1988). Según este, se realizaron dos ensayos en paralelo, donde uno correspondía al ensayo control del otro. En ambos se utilizó una mezcla de 2,5 mL total formada por 0,35 mL de una solución compuesta por Tris-Magnesio-Tritón, 0,05 mL de AMP (10mM), 0,09 mL de una solución de NaCl (0,1M) y al ensayo se agregó 0,05 mL de muestra de cada alícuota representativa de las distintas centrifugaciones realizadas. Ambas mezclas se incubaron a 37°C durante 2 horas para luego agregarles 250 µL de molibdato de amonio, y al ensayo control se le agregó los 0,05 mL de muestra de cada etapa del fraccionamiento subcelular. Luego se le agregó a ambos ensayos 1,5 mL de agua para, finalmente, agregar a ambos ensayos 250 µL de Eicomorgen. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para después proceder a la lectura de la absorbancia a 660nm en un lector de ELISA (BioTek, modelo EL800).

### III. Generación de LP microsómica *in vitro*.

Se realizaron ensayos de LP utilizando el  $\text{Fe}^{+3}$ /ascorbato como agente generador de estrés oxidativo. En la figura 9 se muestra que esta reacción se basa en la capacidad del  $\text{Fe}^{+2}$  para reaccionar con ROS de baja citotoxicidad, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , convirtiéndolo en otros ROS más reactivos, como el  $\text{OH}^\cdot$ , capaz de generar daño celular.



**Figura 9: Reacción de Haber-Weiss/Fenton**

El ascorbato participa como agente reductor del  $\text{Fe}^{3+}$  permitiendo que la reacción de Fenton se comporte como autocatalítica, aumentando así, el daño a las moléculas biológicas (Evans y Halliwell, 2001).

El protocolo realizado para generar la LP microsómica *in vitro* fue el descrito por Letelier *et al*, (2005), que consiste en la utilización de una mezcla de reacción de 1 ml volumen final, constituida por 100  $\mu\text{L}$  de fracción enriquecida de membrana obtenida a partir de hígado de rata (que contiene 1 mg de proteína) suspendida en 800  $\mu\text{L}$  de amortiguador fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  600  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{L}$  de ascorbato 1 mM. Las soluciones de  $\text{FeCl}_3$  y de ascorbato se prepararon inmediatamente antes de cada ensayo. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 30 minutos en un baño termostático (Haake Fisons B3) con agitación constante. La reacción se detuvo mediante la precipitación de las proteínas al agregar 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 20%P/V en frío (4°C). Finalmente la mezcla fue sometida a una centrifugación a 15.000xg durante 10 minutos a 4°C.

Esta metodología fue estandarizada para una muestra de hígado de equino, evaluando el tiempo de incubación necesario para la generación de la LP microsómica *in vitro*, a través del sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /Ascorbato.

**IV. Metodología para la detección de productos finales de la LP de membranas plasmáticas.**

**a) TBARS.**

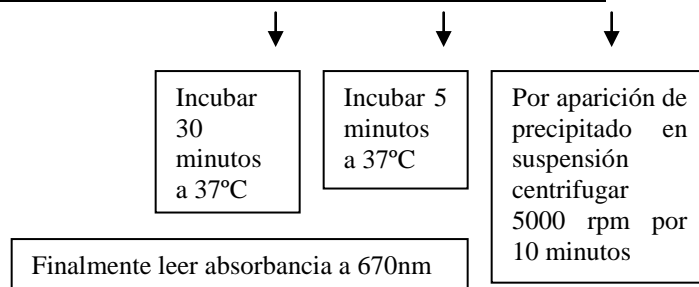
Esta metodología consiste en evaluar la reacción que ocurre entre el MDA (aldehído producido en el proceso de LP de membrana) y el TBA (Halliwell y Chirico, 1993). Para utilizar esta técnica se utilizó el siguiente protocolo: a 400 µL de SN, obtenido de la centrifugación realizada para la generación de la LP, se le agregó 500 µL de TBA 1% P/V. La mezcla se homogeneizó y se incubó en un baño termostático (Haake Fisons B3) durante 60 minutos a 50°C con agitación constante. El complejo formado por MDA y TBA produjo una reacción colorimétrica a la que se le determinó su absorbancia en un espectrofotómetro (Unicam modelo UV/Vis Spectrometer) a 532 nm.

**b) MBTH.**

La metodología utilizada (protocolo base) para la determinación de la concentración de aldehídos en el LS, con el fin de cuantificar la degradación del cartílago articular, fue el descrito en la tabla 1.

**Tabla 1: Protocolo de la metodología del MBTH para la determinación de grupos aldehídos en el LS (Adarmes *et al.* 2006).**

Tubo	Acetaldehído 10 <sup>-3</sup> M (µL)	H <sub>2</sub> O (µL)	LS (µL)	MBTH 1% (µL)	FeCl <sub>3</sub> 0,2% (mL)	Acetona (mL)
Blanco	0	400	0	100	1,3	3,2
1	25 (0,025µmoles)	375	0	100	1,3	3,2
2	50 (0,05 µmoles)	350	0	100	1,3	3,2
3	75 (0,075µmoles)	325	0	100	1,3	3,2
4	100 (0,1 µmoles)	300	0	100	1,3	3,2
LS	0	300	100	100	1,3	3,2



A partir de esta metodología se comenzó a realizar la estandarización de ella con el fin de adaptarla a la determinación de productos de la LP de membranas plasmáticas. La metodología originalmente propuesta fue la siguiente: a 400  $\mu\text{L}$  de SN, obtenido de la centrifugación realizada para la generación de la LP, se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de MBTH 1% P/V. Esta mezcla se mantuvo a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este período, se agregó a la mezcla 1,3 mL de  $\text{FeCl}_3$  0,2% P/V y se dejó a 37°C durante 5 minutos. Finalmente se le agregó 3,2 mL de acetona y se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro (Unicam modelo UV/Vis Spectrometer) a 670 nm.

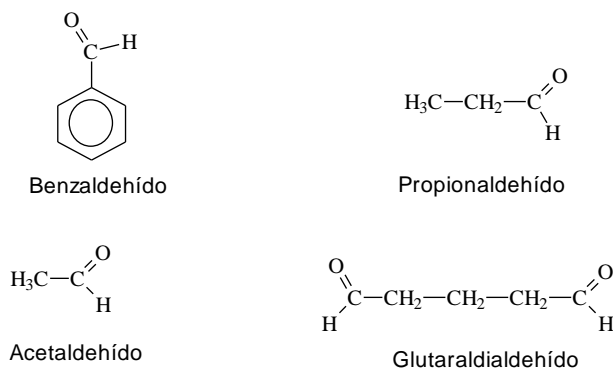
Con el fin de estandarizar esta metodología a las condiciones de los ensayos de LP, se sometió el protocolo a distintas pruebas, como:

- Se evaluó este protocolo con distintas cantidades de MBTH, para descartar a este factor como limitante de la reacción.
- Se evaluó el protocolo sin acetona, ya que en ciertos casos al agregarle este reactivo, de acuerdo al protocolo original, se formaba un precipitado que obligaba a centrifugar la mezcla para poder leer su absorbancia espectrofotométricamente. De esta forma, con el fin de eliminar esa centrifugación del protocolo original, se determinó el tiempo necesario para la estabilización de la reacción calorimétrica sin la utilización de acetona.

Todos los ensayos se realizaron en triplicado

#### V. Reactividad del MBTH y del TBARS con distintos aldehídos.

Con el fin de obtener una curva estándar y determinar el grado de especificidad reactiva, tanto para el MBTH (técnica ya estandarizada) como para el TBARS se utilizaron, para ambas reacciones, distintos aldehídos en dos concentraciones distintas:  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M. Los aldehídos evaluados se muestran en la figura 10.



**Figura 10: Estructura de los aldehídos utilizados.**

## VI. Evaluación del posible efecto interferente de la glucosa.

Para evaluar el efecto interferente de la glucosa en las determinaciones de los productos de la LP en ambas metodologías, se utilizaron distintas concentraciones de glucosa donde se incluyó la concentración fisiológica sanguínea del equino (60 – 100 mg%). El protocolo utilizado se muestra en la figura 11.

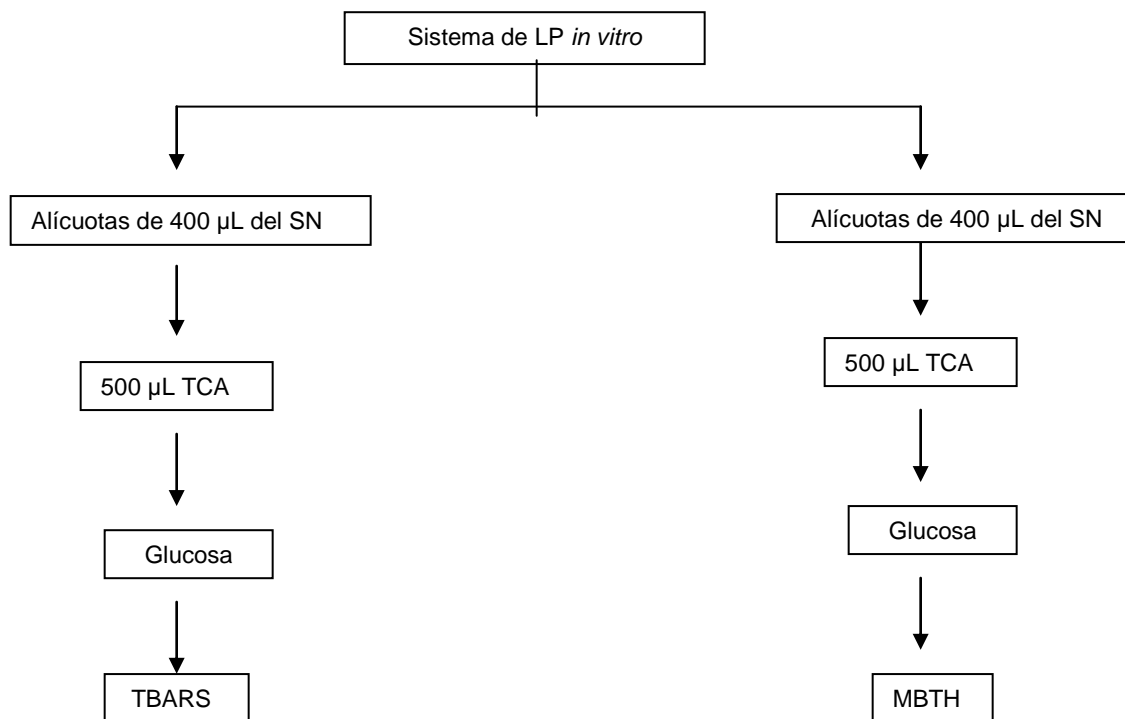
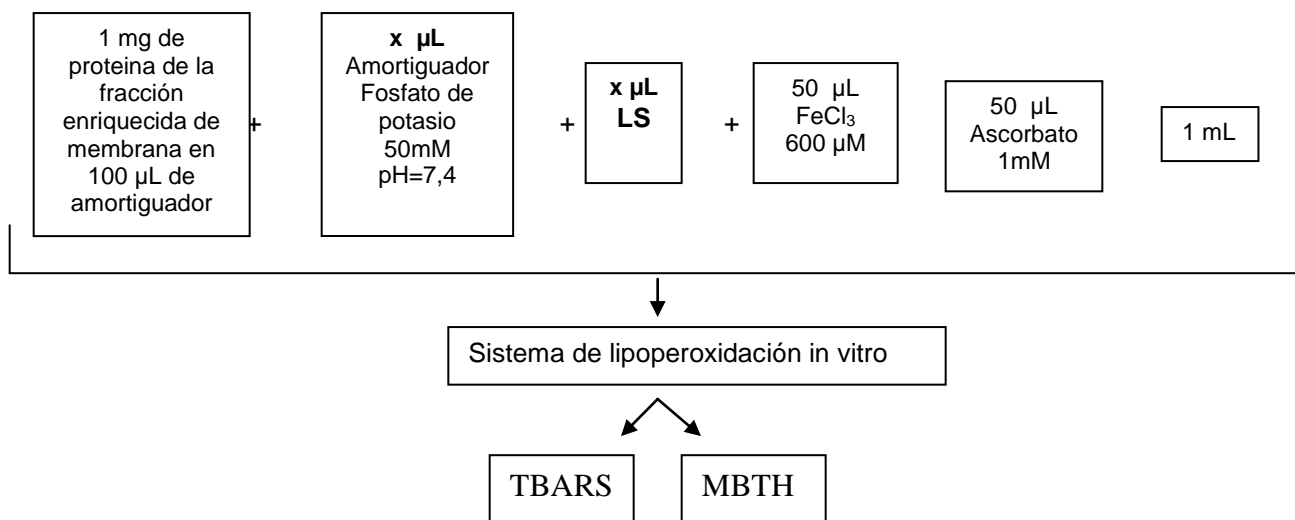


Figura 11: Protocolo para evaluar el efecto interferente de la glucosa con la metodología del TBARS y del MBTH.

## VII. Evaluación del efecto inhibitorio del LS sobre la LP *in vitro* para ambos metodologías.

Para determinar si la reacción del MBTH es capaz de medir el efecto inhibitorio del LS sobre la LP *in vitro*, aspecto que fue demostrado utilizando la reacción de TBARS en el mismo sistema (Müller 2008), se utilizaron diferentes diluciones de LS en el protocolo anteriormente estandarizado. El protocolo utilizado se describe en la figura 12.



**Figura 12: Protocolo para evaluar el efecto AO del LS con la metodología del TBARS y del MBTH.** Los volúmenes de LS utilizados fueron: 10 µL, 25 µL, 50 µL y 100 µL.

### VIII. Análisis Estadístico

En general para la descripción de resultados se relacionó la absorbancia obtenida con la variable experimental asociada a la LP. Sin embargo, en algunos ensayos como fue la determinación de la precisión (repetibilidad de las determinaciones) de ambas reacciones colorimétricas, se utilizó el promedio de las absorbancias obtenidas de cinco determinaciones independientes  $\pm$  desviación estándar. Para la determinación de las diferencias significativas se utilizó la prueba de Kolmogorov - Smirnov a través del programa Statistica 6.0.

## RESULTADOS

### Determinación del rendimiento del fraccionamiento subcelular a partir de hígado de equino.

Con el fin de determinar la pureza de la muestra de fracción microsómica obtenida se determinó la actividad de la enzima LDH (enzima citosólica) y de la 5`-nucleotidasa (enzima marcador de membrana).

#### a) Actividad de la enzima LDH

Para determinar la posible contaminación citosólica en la fracción microsómica obtenida, se determinó la actividad de la enzima LDH, a través de la lectura de absorbancia (340nm) en distintos minutos después de haber agregado la muestra. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 2: Determinación de la actividad de la LDH.** El protocolo utilizado se encuentra en materiales y métodos.

Determinación de la actividad de la LDH		
	U/mL	Actividad específica
Extracto citosólico	2,74	0,09
Fracción microsomal	0,107	0,003

Según los resultados expuestos en la tabla 2 se encontró que en la fracción microsomal apareció la menor actividad LDH, siendo la fracción citosólica la que presenta los mayores valores para esta enzima. Por esto, la presencia de citosol en la fracción de membrana se puede considerar despreciable.

#### b) 5` - Nucleotidasa

Para determinar la presencia de membrana en la fracción microsómica obtenida se determinó la actividad de la enzima 5` - nucleotidasa. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 3: Determinación de la actividad de la 5` - nucleotidasa.** El protocolo utilizado se encuentra en materiales y métodos.

Determinación de la actividad de la 5` - nucleotidasa		
	U/mL	Actividad específica
Extracto citosólico	0,024	0,00082
Fracción microsomal	0,032	0,001

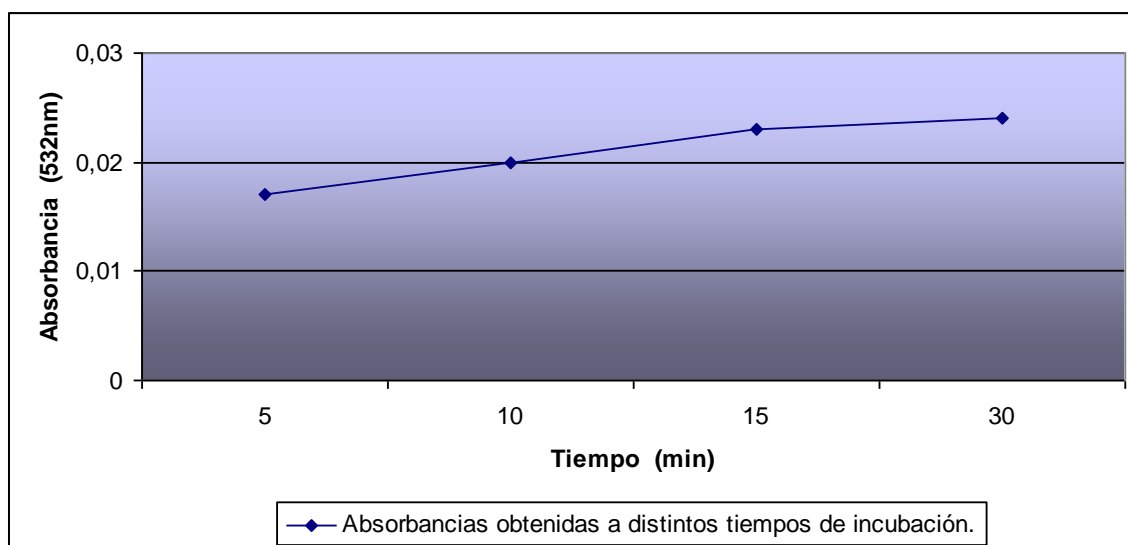
Según lo expuesto en la tabla 3, se detectó actividad 5'-nucleotidasa en la fracción microsómica. Con los resultados obtenidos en las determinaciones de ambas enzimas junto con lo establecido en el protocolo para la obtención de una fracción microsomal, se puede concluir que efectivamente se trabajó con una fracción enriquecida de membrana.

### **Implementación de la LP *in vitro*, a partir de una fracción enriquecida de membrana de hígado equino.**

Para implementar la LP *in vitro*, se utilizó el protocolo descrito por Letelier *et al.* (2005), a partir de un conjunto de muestras de hígado de equino (13 muestras). En todos los ensayos realizados se utilizó una concentración de proteína microsómica de 100µg/mL.

#### **a) Tiempo de incubación.**

Con el fin de encontrar las mejores condiciones para realizar la metodología anteriormente mencionada, se evaluó el tiempo de incubación y la estabilidad de la LP microsómica *in vitro*, inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup> /Ascorbato. Ambas condiciones se evaluaron a través de la prueba del TBARS.

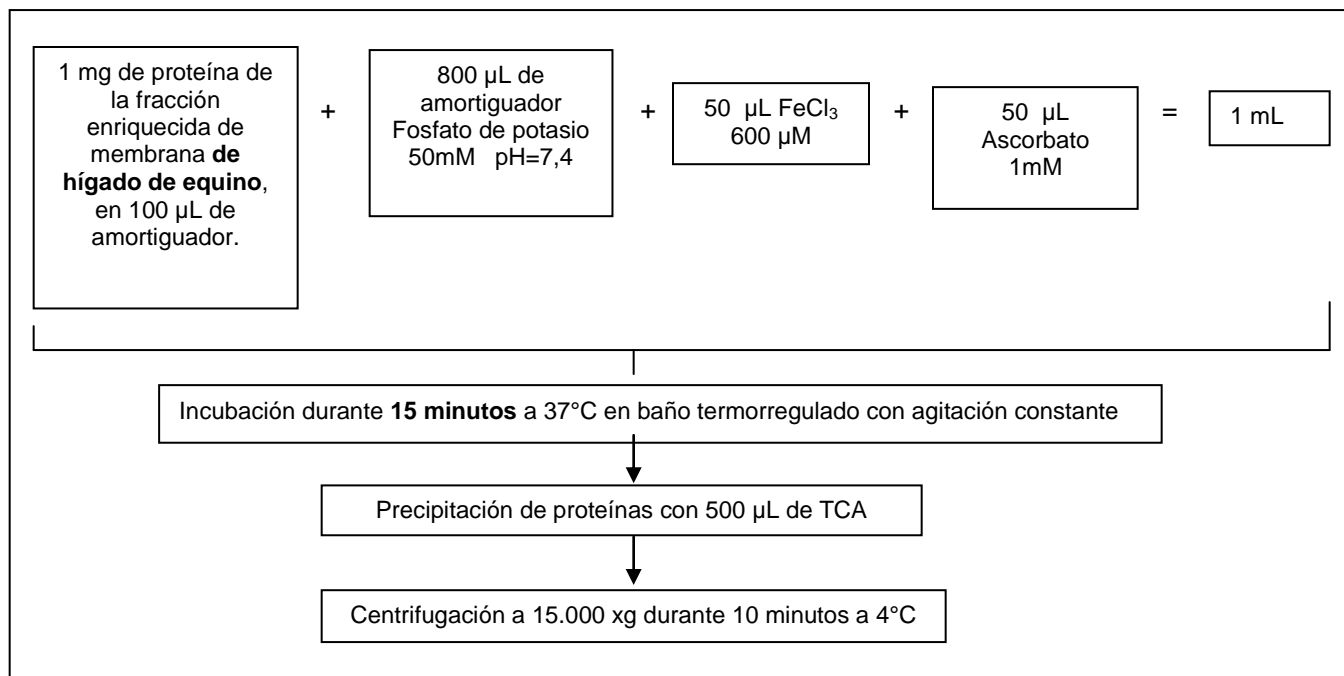


**Figura 13: Distintos tiempos de incubación durante la generación de la LP microsómica *in vitro*.** Cada determinación se realizó en triplicado. La absorbancia obtenida corresponde a la LP neta producida por el sistema Fe<sup>3+</sup> /Ascorbato.

Según los resultados expuestos en la figura 13, se escogió 15 minutos como tiempo de incubación para los diferentes ensayos de LP, dado que a partir de ese tiempo se obtuvo el máximo de absorbancia.



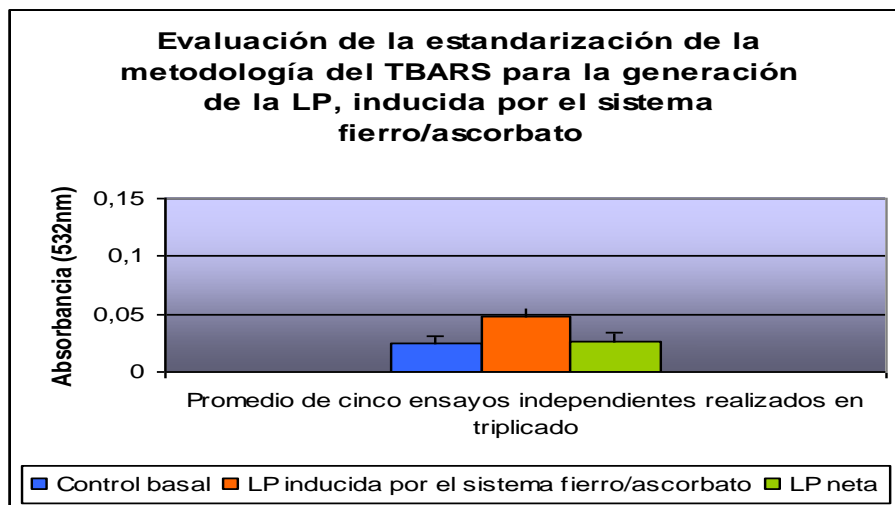
De esta manera el protocolo de la generación de la LP microsómica *in vitro* quedó definido como lo muestra la figura 14.



**Figura 14: Protocolo estandarizado para la generación de la LP microsómica *in vitro*.** La metodología original se encuentra en materiales y métodos.

**b) Precisión de la reacción**

Una vez establecido el tiempo de incubación para la reacción de LP en 15 minutos (figura 16.), se evaluó la precisión de la reacción a través de la prueba del TBARS. Para ello se realizaron 5 ensayos independientes, cada uno de ellos en triplicado. Los resultados fueron los siguientes:



	Absorbancia (532nm)
<b>Control basal</b>	0,0242 ± 0,007
<b>LP inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato</b>	0,0486 ± 0,007
<b>LP neta</b>	0,0265 ± 0,008

**Figura 15: Evaluación de la estandarización de la metodología del TBARS para la generación de la LP, inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato.** Control basal: microsoma en ausencia del sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato (daño pre existente). La LP neta corresponde a la presencia de productos de la LP inducido por el sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato. Cada valor representa el promedio de cinco experimentos independientes +/- desviación estándar (D.S).

De acuerdo a la prueba de Kolmogorov - se encontró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre en control basal y la LP inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato.

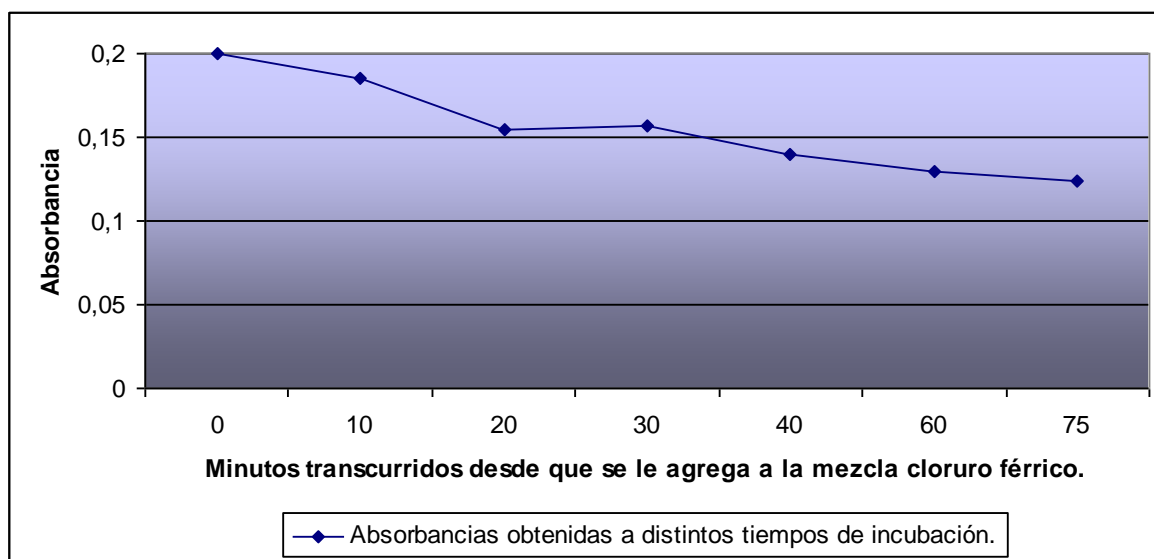
Según los resultados expuestos en la figura 15, se puede indicar que efectivamente se obtuvo una fracción enriquecida en membrana a la que se logró inducir el efecto lipoperoxidativo.

Una vez evaluado el protocolo de la generación de la LP microsómica *in vitro* con la metodología del TBARS se procedió a estandarizar la metodología del MBTH para luego probar dicho protocolo con esta metodología.

**Estandarización de la metodología del MBTH a la determinación de los productos de la LP *in vitro*.**

Debido a que la reacción del MBTH se ha utilizado en la determinación de la concentración de grupos  $-CHO$  en líquidos biológicos, en este trabajo se adaptó esta metodología a la determinación de los productos de la LP. Para esto se estableció un protocolo, tomando como base la reacción del MBTH descrita para la determinación de aldehídos y la metodología del TBARS descrita por Letelier *et al.* (2005). Este protocolo se estandarizó evaluando distintas variables. En todos los ensayos realizados se utilizó una concentración de proteína microsómica de  $100\mu\text{g/mL}$ .

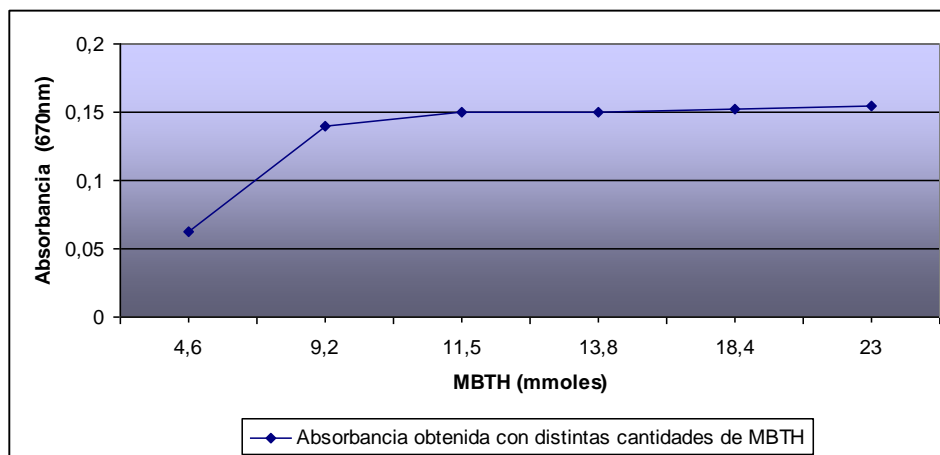
- a) **Tiempo de estabilización de la reacción:** Se evaluaron distintos tiempos de incubación previo a la lectura, para determinar cuanto demora la estabilización de la reacción colorimétrica. Junto a esto, se eliminó la acetona que se utilizaba en protocolos anteriores, y cuyo objetivo se podría asociar a impedir la precipitación de los productos de la reacción. Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 16: Tiempo de estabilización de la reacción.**

Según los resultados expuestos en la figura 16, entre los 20 y 40 minutos se logró la estabilización de la reacción colorimétrica. Por esto, se establecieron los 30 minutos como tiempo de estabilización previo a la lectura de la absorbancia para los ensayos siguientes.

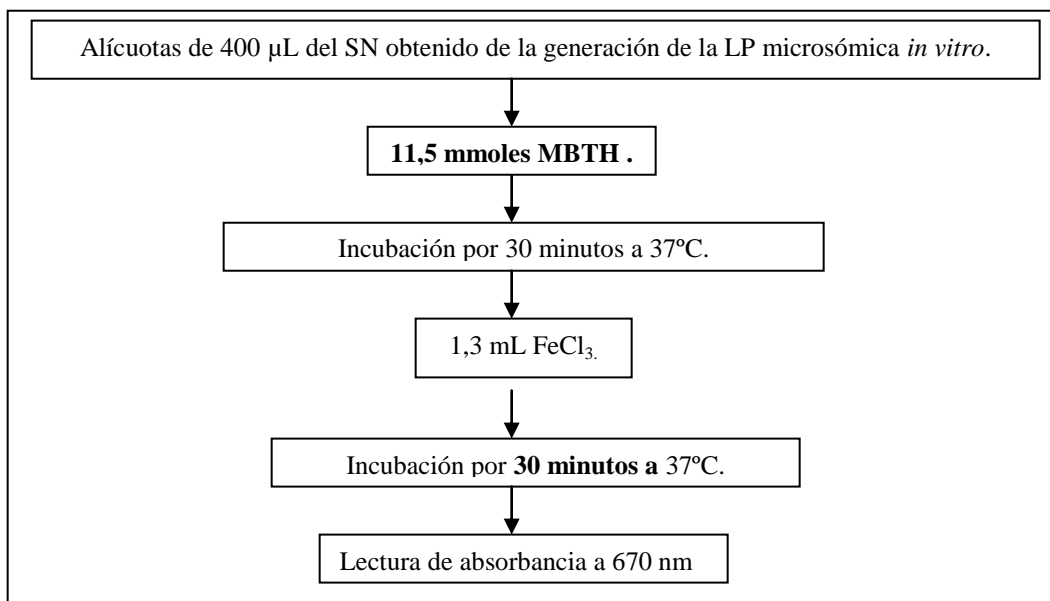
b) **Cantidades de MBTH:** Para evitar que el volumen de MBTH fuera una limitante en el desarrollo de la reacción, se evaluó el protocolo con distintas cantidades de dicho reactivo, a partir de su concentración al 1%. Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 17: Absorbancia al utilizar distintas concentraciones de MBTH**

Según los resultados expuestos en la figura 17, se determinó que a partir de los 11,5 mmoles de MBTH, la reacción tiende a estabilizarse. Por esto se escogieron los 11,5 mmoles como la cantidad de MBTH a utilizar en los ensayos siguientes, ya que correspondió a la menor cantidad con la que se alcanzó una absorbancia estable.

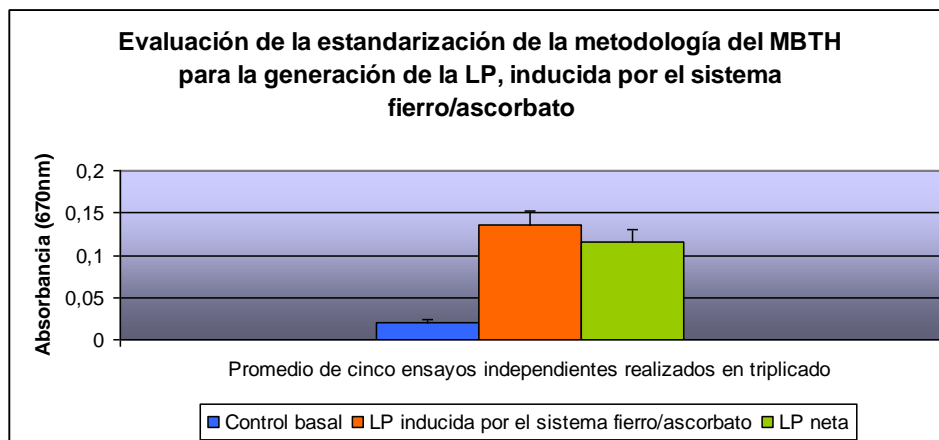
De esta manera el protocolo del MBTH adaptado a la determinación de los productos de la LP *in vitro* es el descrito en la figura 18.



**Figura 18: Protocolo estandarizado para la detección de los productos de la LP con la metodología del MBTH.** La metodología del MBTH original se encuentra en materiales y métodos.

**c) Precisión de la reacción**

Esta estandarización se sometió a prueba con el fin de comprobar la precisión de la reacción. Para ello se realizaron 5 ensayos independientes, cada uno de ellos en triplicado. Los resultados fueron los descritos en la figura 19.



	<b>Absorbancia (670nm)</b>
<b>Control</b>	0,0213 +/- 0,002
<b>LP inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato</b>	0,1364 +/- 0,016
<b>LP neta</b>	0,1150 +/- 0,015

**Figura 19: Evaluación de la estandarización de la metodología del MBTH para la generación de la LP, inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato.** El Control basal es el microsoma en ausencia del sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato (daño pre existente). La LP neta corresponde a la presencia de productos de la LP inducido por el sistema Fe<sup>3+</sup>/Ascorbato. Cada valor representa el promedio de cinco experimentos independientes ± D.S.

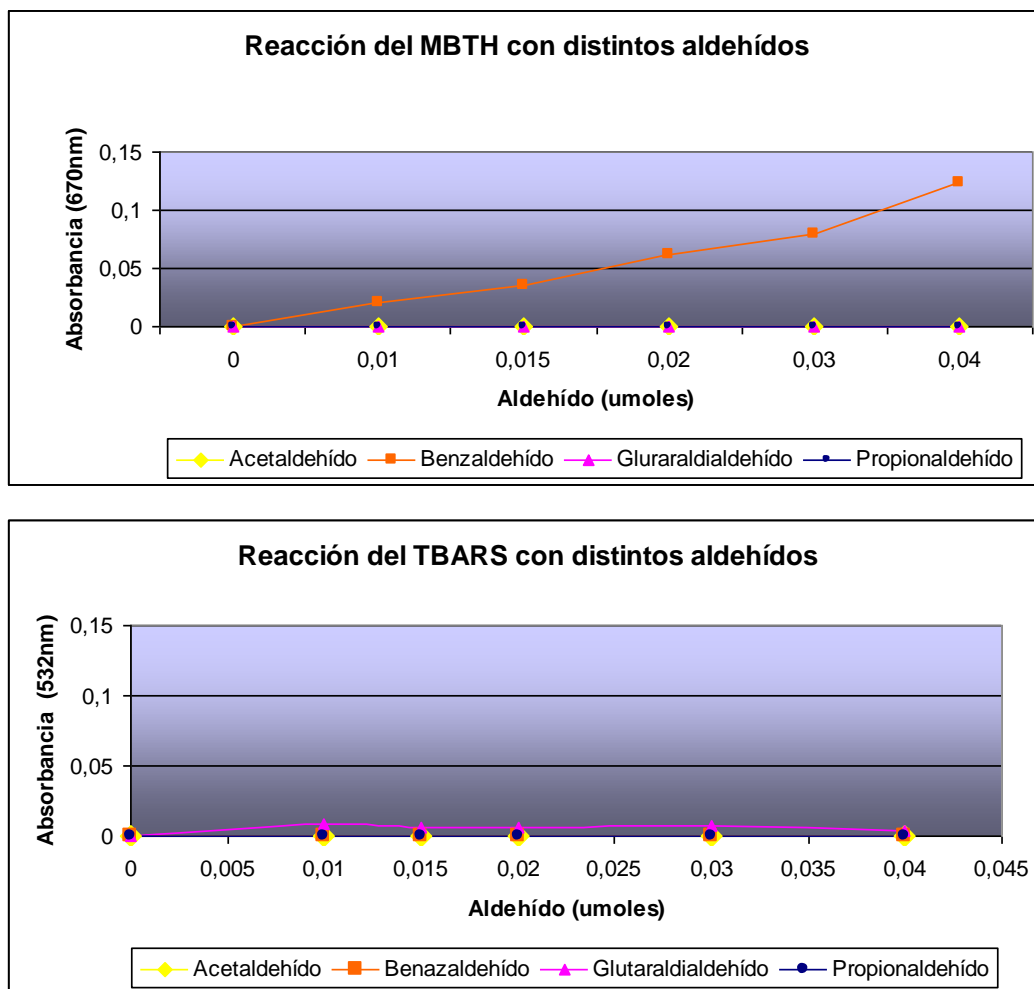
Con la prueba de Kolmogorov – Smirnov se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre en control basal y la LP inducida por el sistema Fe<sup>3+</sup>/ascorbato para la metodología del MBTH.

Según los resultados expuestos en la Figura 19, se puede indicar que se logró obtener una fracción enriquecida en membrana a la que se indujo daño lipoperoxidativo, y cuyos productos se detectaron con mayor intensidad con la metodología del MBTH (ya estandarizada para la detección de los productos de la LP) con respecto a la del TBARS.

### Reactividad del MBTH y del TBARS con distintos aldehídos.

Con el fin de determinar el grado de especificidad reactiva, se evaluaron ambas técnicas con distintos aldehídos a partir de dos concentraciones distintas:  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M.

#### a) MBTH y TBARS con distintos aldehídos a partir de una concentración de $10^{-3}$ M.



**Figura 20: Reacción del MBTH y del TBARS con distintos aldehídos a partir de una concentración de  $10^{-3}$  M.** Cada determinación se hizo en triplicado.

Según lo expuesto en la figura 20, se puede observar que en este rango de concentraciones de los distintos aldehídos no se detectó absorbancia, con ambas técnicas, salvo para el caso del benzaldehído con la reacción del MBTH, donde se encontró una relación directa entre la cantidad del aldehído y su absorbancia.

b) MBTH y TBARS con distintos aldehídos a una concentración de  $10^{-2}$  M.

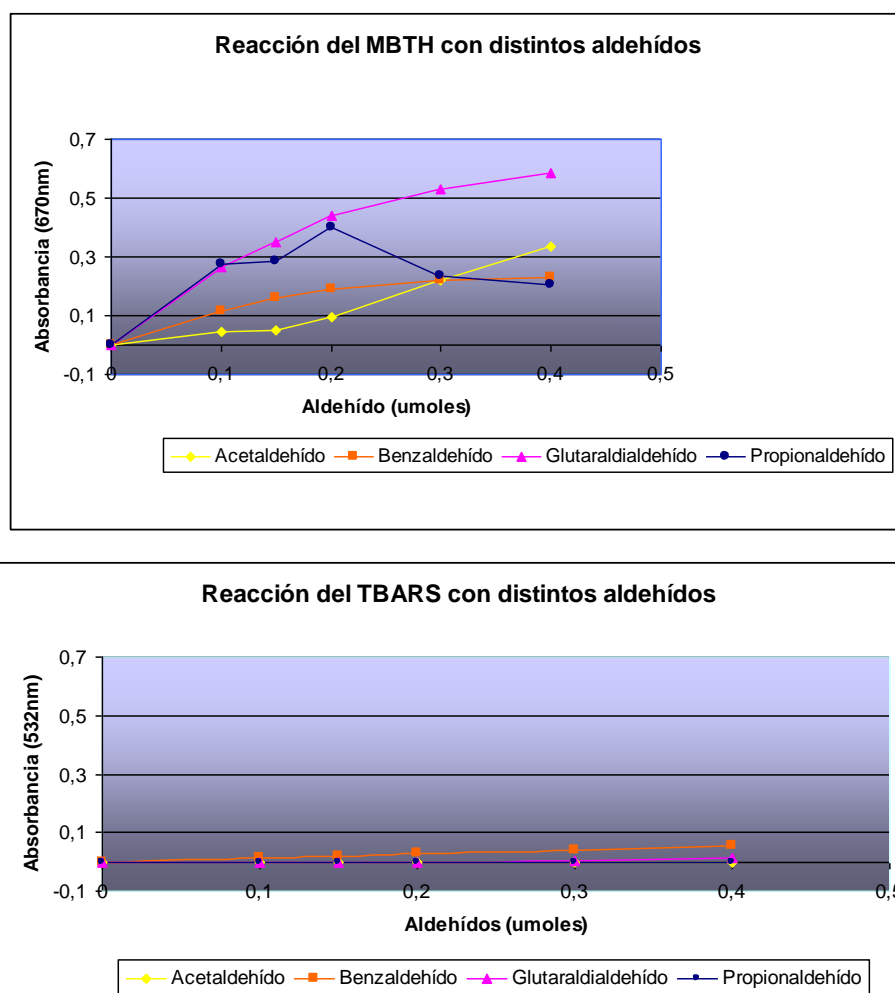
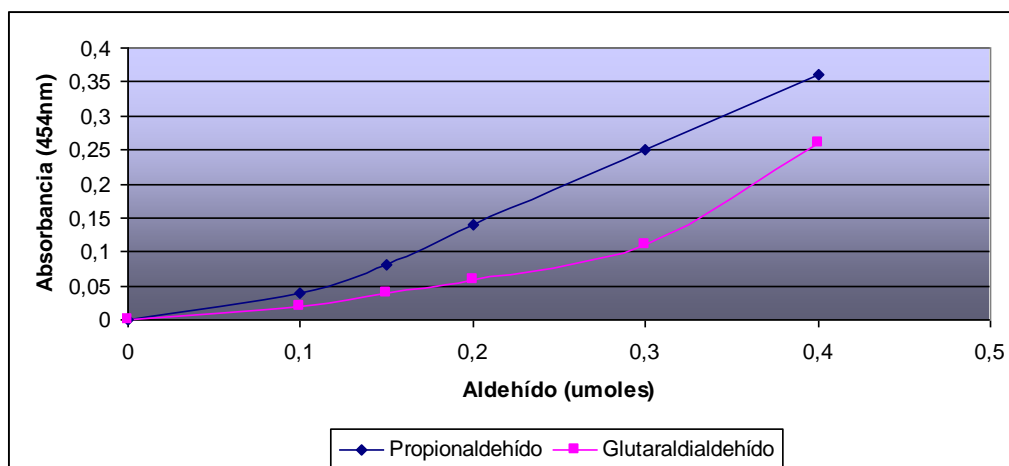


Figura 21: Reacción del MBTH y del TBARS con distintos aldehídos a partir de una concentración de  $10^{-2}$  M.

Según lo expuesto en la figura 21, se puede observar que con la metodología del MBTH se detecta reacción, en una relación directa entre la cantidad del aldehído y su absorbancia, lo cual no ocurre con el TBARS, donde sólo se detecta absorbancia con el benzaldehído y con el glutaraldialdehído cuando se utiliza una cantidad mayor.

Cabe destacar que en el caso de la metodología del TBARS, tanto el glutaraldialdehído como el propionaldehído dieron una curva marcada de color amarillo (distinto a la curva descrita en la metodología inicial que es de color rosado), cuyo máximo valor de absorbancia se estableció a los 454nm. En estos casos los resultados obtenidos fueron los siguientes:



**Figura 22: Reacción del TBARS con propionaldehído y glutaraldialdehído a partir de una concentración  $10^{-2}$  M.**

Según lo expuesto en la figura 22, se puede determinar que a 454 nm, sí ocurre una reacción colorimétrica proporcional a las cantidades utilizadas, hecho que no ocurrió cuando se determinó la absorbancia a 532nm.

#### **Evaluación del posible efecto interferente de la glucosa $10^{-1}$ M sobre la técnica del MBTH y del TBARS.**

Para evaluar a la glucosa como un posible interferente en la medición de los productos de la LP se realizaron dos ensayos con ambas metodologías. El primero orientado a determinar si, en ausencia de fracción microsomal, cada una de las metodologías era capaz de reaccionar con glucosa, y el segundo ensayo estuvo orientado a determinar si la glucosa era capaz de actuar como un interferente (por ende, en presencia de fracción microsomal) en la lectura que cada técnica realiza de los productos de la LP.

##### **a) Reacción entre MBTH y el TBARS con distintas cantidades de glucosa $10^{-1}$ M, en ausencia de fracción microsomal.**

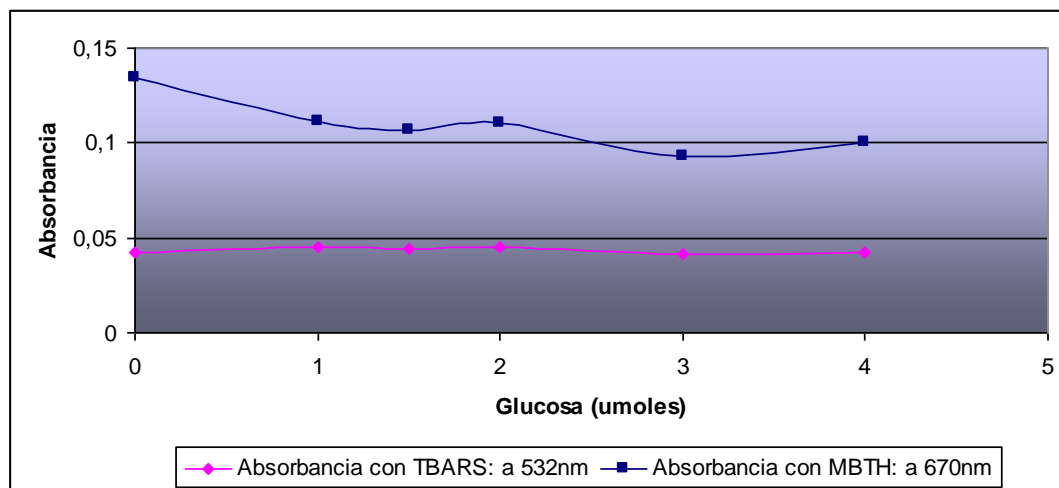
Al probar la reacción entre el MBTH y el TBARS con distintas cantidades de glucosa, en ausencia de fracción microsomal, no hubo reacción colorimétrica con ninguna de las metodologías, por lo



que se determinó que tanto el MBTH como el TBARS no son capaces de reaccionar con el grupo aldehído de la glucosa en las condiciones experimentales utilizadas. Las metodologías del TBARS y la del MBTH con glucosa se encuentran descritas en materiales y métodos

**b) Reacción entre MBTH y el TBARS con distintas cantidades de glucosa  $10^{-1}$  M, en presencia de fracción microsomal.**

Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 23: Reacción del TBARS y del MBTH con glucosa  $10^{-1}$ M, en presencia de la fracción microsomal.** La concentración de proteína microsómica utilizada fue de  $100\mu\text{g/mL}$ . El control (0  $\mu\text{L}$  glucosa) corresponde a la fracción microsomal sin glucosa. Ambos protocolos se encuentran en materiales y métodos. En ambas metodologías, cada determinación se representa al promedio de 3 experimentos independientes.

Según los resultados expuestos en la figura 23, se estableció que la glucosa a una concentración  $10^{-1}$  M, no reacciona colorimetricamente con ninguna de las dos metodologías, y por ende, no interfiere con las reacciones colorimétricas de los productos de la LP.

**Evaluación del efecto AO del LS sobre la LP *in vitro* con la metodología del MBTH y del TBARS.**

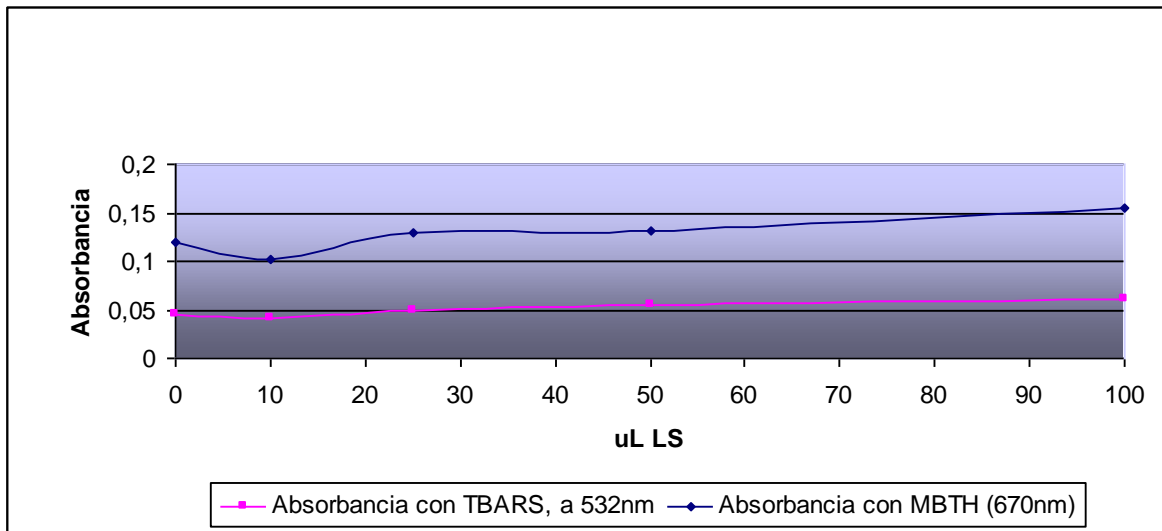
**a) Reacción entre MBTH y el TBARS con distintos volúmenes de LS, en ausencia de fracción microsomal.**

Al probar la reacción entre el MBTH y el TBARS con distintos volúmenes de LS, en ausencia de fracción microsomal, no fue posible obtener reacción colorimétrica ni con la metodología del

TBARS ni con la del MBTH. La metodología del TBARS y la del MBTH con LS se encuentran descritas en materiales y métodos.

**b) Reacción entre MBTH y el TBARS con distintos volúmenes de LS, en presencia de fracción microsomal.**

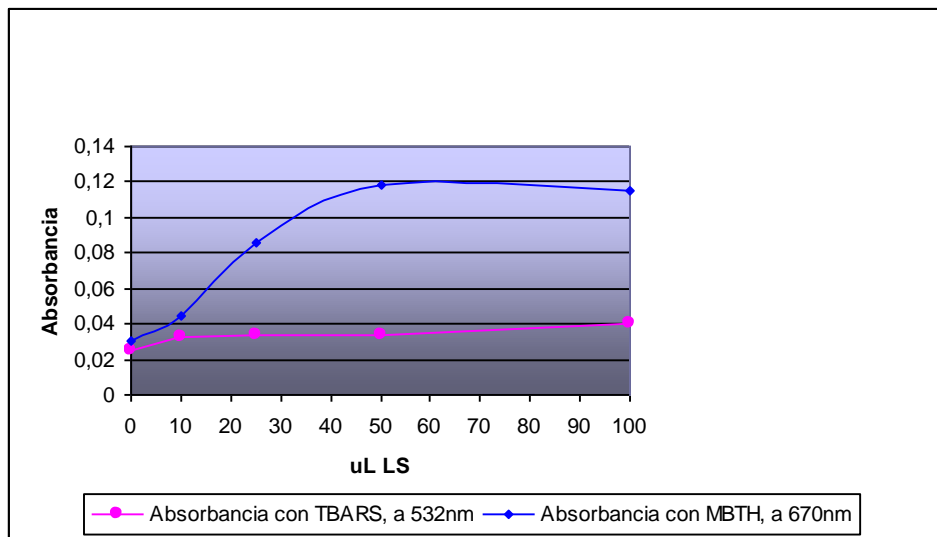
Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 24: Absorbancia con distintos volúmenes de LS, en presencia de fracción microsomal.** La concentración de proteína microsómica utilizada fue de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El control (punto 0) corresponde a la fracción microsomal sin LS. El ensayo del TBARS y del MBTH con LS se encuentra descrito en materiales y métodos. En ambas metodologías, cada valor representa el promedio de 4 experimentos independientes.

Según los resultados expuestos en la figura 24 no se logró detectar en estas condiciones experimentales, el efecto AO del LS, descrito por Müller (2008) para la metodología del TBARS.

Por esto se probó el mismo protocolo pero con la mitad de la concentración de la fracción microsomal utilizada anteriormente. Los resultados son los expresados por la figura 25.



**Figura 25: Absorbancia con distintos volúmenes de LS, en presencia de fracción microsomal.** La concentración de proteína microsómica utilizada fue de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El control (punto 0) corresponde a la fracción microsomal sin LS. El ensayo del TBARS y del MBTH con LS se encuentra descrito en materiales y métodos.

En este ensayo tampoco se manifestó el efecto AO descrito para el LS.

## DISCUSIÓN

Para obtener la fracción microsómica se utilizó el protocolo de Letelier *et al.* (2005), pero en vez de utilizar una muestra de hígado de rata (como está descrito en dicho protocolo) se utilizó hígado equino, obtenido del Matadero La Pintana. Para tener muestras lo más homogéneas posibles se extrajo aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes del lóbulo cuadrado. Es importante destacar que al obtener las muestras de esta forma se obvia el costo de compra o crianza de ratas de laboratorio, y aunque se puede sacrificar la homogeneidad del lote, los equinos son animales en los que no se espera encontrar diferencias importantes en su alimentación, principalmente si se considera que todas las muestras se obtuvieron en la misma época del año y todas venían de animales jóvenes y de hígados sanos, a la inspección visual. Con esta muestra se obtuvo la fracción microsómica, la cual fue sometida a distintas evaluaciones. Primero, con el fin de caracterizar las condiciones de la fracción de membrana obtenida, se sometió dicha fracción a la determinación de la actividad de las enzimas 5`- Nucleotidasa y de la LDH. Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente se obtuvo una fracción enriquecida de membranas, ya que se presenta una importante actividad de la enzima 5`- Nucleotidasa (enzima marcadora de membrana) y que, al casi no haber actividad de la enzima LDH, la presencia de citosol en la fracción microsómica obtenida era casi nula. Cabe destacar que el protocolo seguido para obtener el homogeneizado (Letelier *et al.* 2005) no incluía inhibidor de proteasas. Es por esto que al realizar la determinación de las actividades enzimáticas, los valores obtenidos fueron distintos a los esperados, pero mantuvieron la tendencia necesaria para poder concluir que efectivamente se tenía una fracción microsómica. Además, se parte de la base que en el mismo protocolo utilizado para obtener el homogeneizado se encuentra la información de que al final del proceso se espera tener una fracción microsómica y no otros componentes celulares. Con estos dos antecedentes, y con el hecho de que los ensayos (descritos para una fracción microsómica) funcionaron de acuerdo a lo esperado, se concluyó que el trabajo se llevó a cabo sobre una fracción microsómica.

Una vez caracterizada la fracción microsómica, se continuó con el protocolo descrito por de Letelier *et al.* (2005), donde, a través del sistema  $Fe^{+3}$ /ascorbato se indujo daño oxidativo (específicamente a través de las reacciones descritas en la ecuación de Haber-Weiss/Fenton) (Sorg, 2004), el cual fue determinado a través de la metodología del TBARS (descrita en el mismo protocolo). A pesar de que esta metodología posee un protocolo bien definido, que se basa en la reacción de 1:2 entre el MDA y el TBA respectivamente (Janero, 1990), se realizaron algunos ensayos orientados a probar si la metodología descrita era capaz de determinar el daño oxidativo inducido en la fracción microsómica proveniente de hígado equino de la misma forma que lo hacía en la fracción microsómica proveniente de hígado de rata.

Sin embargo, debido a la inespecificidad que se ha descrito para la metodología del TBARS (Halliwell y Chirico, 1993), se utilizó el MBTH como una metodología alternativa para la determinación de los

productos de la LP. Se adaptó la metodología a este propósito y se obtuvieron resultados colorimétricos que indican que sí es capaz de reaccionar con productos provenientes de la LP de membrana. Inicialmente el MBTH se describió como una metodología capaz de reaccionar con aldehídos alifáticos hidrosolubles (Sawicki *et al.*, 1961). Luego se propuso al MBTH como una metodología capaz de detectar el daño articular temprano, debido a su capacidad de reaccionar con grupos aldehídos presentes en el LS. Se postuló que estos aldehídos provenían de la degradación del colágeno tipo II durante el proceso patológico (Horvath *et al.*, 1983). Sin embargo, si el MBTH es capaz de reaccionar con los productos de la LP, donde se encuentran distintos aldehídos, se abriría la posibilidad de que en una articulación dañada el MBTH pudiera reaccionar con aldehídos provenientes de los procesos de LP y no únicamente con los aldehídos liberados por la degradación del colágeno tipo II. De esta forma queda planteada la disyuntiva sobre qué es lo que realmente mide el MBTH cuando reacciona en el LS, si la degradación de colágeno debido a la activación de colagenasas y/o al proceso de LP intra articular cuando se desencadena el estrés oxidativo. Al igual que lo que ocurre con el TBARS, no se tiene total certeza sobre qué sustrato específico estaría reaccionando el MBTH, pero al saber que es capaz de reaccionar con ciertos aldehídos, se podría proponer que al igual que el TBA, el MBTH podría reaccionar con el MDA.

A pesar de que las lecturas de absorbancia obtenidas con ambas metodologías se realizan a distintas longitudes de onda, los resultados obtenidos con el MBTH arrojan valores más altos que los obtenidos con el TBARS. Esto podría deberse a que el MBTH es capaz de reaccionar con más productos de la LP o que es capaz de reaccionar con el mismo producto de una manera mayor, pudiendo ser una metodología más sensible que el TBARS (figura 20 y 21).

Para intentar establecer la reactividad específica del TBARS y del MBTH con los productos de la LP, se probaron ambas metodologías con distintos aldehídos (ya que durante la LP se producen distintos tipos de aldehídos). Se probó el glutaraldialdehído, el propionaldehído, el acetaldehído y el benzaldehído a dos concentraciones distintas. Cuando se utilizaron más diluidos (a una concentración de  $10^{-3}$  M) con el MBTH sólo el benzaldehído dio reacción colorimétrica y con el TBARS ninguno de los aldehídos generó dicha reacción. Distinto fue el caso cuando se probaron los aldehídos más concentrados (a una concentración de  $10^{-2}$  M), ya que acá, con el MBTH todos los aldehídos evaluados reaccionaron colorimétricamente, en forma proporcional a las cantidades utilizadas. El TBARS se comportó de una forma similar con el benzaldehído, y sólo con el glutaraldialdehído cuando se utilizaron mayores volúmenes.

Estos resultados podrían reafirmar el postulado de que el MBTH podría ser más sensible, ya que es capaz de reaccionar con las mismas moléculas a una concentración menor que lo que ocurre con el TBARS. También permiten objetar la idea de que el MBTH sea menos específico que el TBARS, debido a que esta metodología da reacción colorimétrica sólo cuando los aldehídos están

más concentrados, lo que permite pensar que pueden reaccionar con los mismos productos, siendo la diferencia sólo un tema de concentraciones, y por ende de sensibilidad de las metodologías.

Es importante estandarizar más las reacciones que ocurren con cada una de las metodologías y los aldehídos, ya que no se comportan igual en todos los casos. Es el caso de la reacción entre el MBTH y el propionaldehído, que es el único aldehído que con esta metodología muestra una conducta diferente. Esto se debe a que no genera una curva proporcional al volumen utilizado, sino que se produce una figura donde se muestra que después de cierta cantidad de propionaldehído, la reacción colorimétrica con el MBTH comienza a disminuir (Figura 21). El TBARS también muestra irregularidades en su reacción con los aldehídos, ya que con el propionaldehído y el glutaraldialdehído (cuando se encuentran a una concentración de  $10^{-2}$  M) se genera una reacción colorimétrica positiva, proporcional a los volúmenes utilizados, pero de un color amarillo y no rosado como el que se obtiene con el benzaldehído y con él o los productos de la LP que son capaces de reaccionar con el TBA (como se describe en el protocolo de Letelier *et al.* (2005)) (Figura 22). Esta diferencia de color obtenido abriría la posibilidad de que el complejo formado entre el propionaldehído y/o el glutaraldialdehído con el TBA presente una estructura distinta.

La metodología del TBARS es muy útil en sistemas de membranas aislados (por ejemplo en microsomas o liposomas), pero cuando se aplica a fluidos biológicos y a extractos de tejidos presenta varios problemas relacionados principalmente con su inespecificidad (Janero, 1990). Es por esto que se quiso probar ambas metodologías en presencia de glucosa, molécula presente en muchos fluidos biológicos y que además presenta, en su estructura lineal, un grupo aldehído. Al probar la glucosa (a una concentración de  $10^{-1}$  M) con el TBARS y con el MBTH, en ausencia de la fracción microsómica, no se observó reacción colorimétrica alguna, por lo que o ninguna metodología es capaz de reaccionar con dicha molécula o ambas metodologías son poco sensibles para la glucosa, pudiendo reaccionar con ella a concentraciones más altas. Cuando se experimentó ahora en presencia de fracción microsómica el resultado no se alteró, ya que las lecturas de absorbancia normalmente obtenidas con cada metodología se mantuvieron constantes, aún estando en presencia de glucosa.

Tanto Müller (2008) como Villasante *et al.* (2009), describieron que el LS, en ciertas circunstancias, presentaba capacidad AO. Ambos midieron esto con metodologías distintas, pero Müller (2008) lo determinó a través de la metodología del TBARS, estableciendo que, en presencia de la fracción microsómica de hígado de rata, el LS proveniente de una articulación que tuviera la membrana sinovial sana (lo que ocurre en una articulación sana y en una con daño crónico), o sea sin estar congestiva, presentaba actividad AO, sin tener una relación proporcional al volumen de LS utilizado. Al evaluar este efecto AO con el TBARS, en presencia de la fracción microsómica de

hígado de equino, esta capacidad AO no se manifestó, ya que la reacción colorimétrica característica que se da entre el TBA y el MDA no se alteró. Lo mismo ocurrió al probar el sistema con el MBTH, donde los resultados de la LP no se vieron alterados en presencia de LS. Ambas metodologías se utilizaron con el LS en ausencia de fracción microsomal para determinar si existía algún producto de la LP en dicha muestra, siendo negativo tanto en la metodología del TBARS como en la del MBTH. Este resultado era esperado, ya que al examen macroscópico las articulaciones de las cuales se obtuvo el conjunto de LS estaban sanas. Es importante destacar que con la metodología del MBTH incluso se ve un aumento en la absorbancia cuando se le agrega LS, por lo que en este caso, el LS, a pesar de no reaccionar con el MBTH en ausencia de fracción microsómica, genera un aumento en la lectura. Esto sugiere que el LS, en las condiciones experimentales descritas para el MBTH, reaccionaría como un estimulador de la LP.

Llama la atención que en esta memoria de título no se manifestara la capacidad AO descrita previamente, ya que la única diferencia entre ambos protocolos es el hecho de que el hígado viene de distintas especies animales. Por esto se evaluó la posibilidad de que por ser muestras provenientes de distintas especies animales, la fracción microsómica obtenida de hígado equino pudiera tener alguna molécula, por ejemplo algún AO como la vitamina E, que estuviera frenando el efecto AO del LS. Para comprobar esto se realizó el mismo ensayo pero utilizando la fracción microsómica a la mitad (50µg/mL) de la concentración anteriormente evaluada. A pesar de esta modificación, la tendencia fue la misma y no se manifestó el efecto AO del LS,

## CONCLUSIONES

- I. Las actividades de las enzimas LDH y 5'-nucleotidasa determinadas en el precipitado obtenido, junto con el protocolo realizado para obtener el homogeneizado, demuestran que se logró purificar la fracción microsomal a partir de hígado de equino.
- II. La fracción microsomal obtenida desde hígado de equino, al igual que la fracción microsomal obtenida a partir de hígado de rata, es capaz de generar productos de LP en presencia del sistema  $\text{Fe}^{3+}$  /Ascorbato.
- III. La metodología del MBTH sería más sensible que la del TBARS en la detección de los productos de la LP y en la reacción con grupos aldehídos.
- IV. La glucosa a una concentración de  $10^{-1}$  M no genera reacción colorimétrica ni con la metodología del MBTH ni con la del TBARS, y tampoco produce interferencia en la reacción que ambas metodologías tienen con los productos de la LP.
- V. El LS no generó reacción colorimétrica ni con la metodología del MBTH ni con la del TBARS ni tampoco mostró capacidad de producir efecto AO en la determinación que cada metodología realiza de los productos de la LP.



## ABREVIATURAS

- **4-HNE:** 4- hidroxinonenal
- **AO:** antioxidante
- **BSA:** seroalbúmina de bovino
- **CAT:** catalasa
- **D.S:** desviación estándar
- **EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica del equino
- **GSH-Px:** glutatión peroxidada
- **HPLC:** cronografía líquida de alto rendimiento
- **LDH:** lactato deshidrogenasa
- **LP:** lipoperoxidación
- **LS:** líquido sinovial
- **MBTH:** 3-metil-2-benzotiazolidon hidrazona
- **MDA:** malondialdehído
- **MP:** mieloperoxodasa
- **PUFA:** ácido graso poliinsaturado
- **RCS:** especies reactivas derivadas del cloro
- **RL:** radicales libres
- **ROS:** especies reactivas derivadas del oxígeno
- **RNS:** especies reactivas derivadas del nitrógeno
- **SN:** sobrenadante
- **SOD:** superóxido dismutasa
- **TBA:** ácido tiobarbitúrico
- **TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- **TCA:** ácido tricloroacético

## BIBLIOGRAFÍA

1. ADARMES, H; CROXATTO. A.; GALLEGUILLOS, M; GONZÁLEZ, E. 2006. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos, y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Arch. Med. Vet. 38 (1): 47 - 52.
2. ALLAN, C.B.; LACOUCIERE, G.M.; STADTMAN, T.C. 1999. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. Ann. Rev. Nutr. 19:1-16.
3. ANTHON, G.E.; BARRETT, D.M. 2002. Determination of Reducing Sugars with 3 – Methyl – 2 – benzothiazolone hydrazone. Anal. Bioch. 305: 287- 289.
4. ARMSTRONG, D; BROWNE, R. 1995. Free Radicals in Diagnostic Medicine: A system Approach to Laboratory Technology, Correlations and Antioxidant Therapy. En Advances in Experimental Medicine and Biology. Armstrong, D. Springer Editores. New York, USA. Vol. 366: 43 – 58.
5. ARTHUR, J.R. 2000. The glutathione peroxidases. Cell. Mol. Life Sci. 57:1825-1835.
6. BANDYOPADHYAY, U.; DAS, D.; BANERJEE, R.K. 1999. reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis (review). Curr. Sci. 77:658-666.
7. BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. 1998. The free radical theory aging matures. Physiol. Rev. Apr. 78 (2):547-581.
8. BONNER, W.D. 1955. Succinic dehydrogenase. In: Kaplan C, Ed. Methods in Enzymology. New York: academic Press. Pp:722-729.
9. BUETTNER, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lípido peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300: 535-543.
10. CÉSPEDES, E.; HERNÁNDEZ, I.; LLOPIZ, N. 1996. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: catalasa. Rev. Cubana Invest. Biomed. 15:23-28.
11. CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILLIOU, R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. Food chem. Toxicol. 37:949-962.
12. CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTEWER, F.G. 2001. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Vet. Mex. 33(3):265-283.
13. CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F. 1993. An introduction to free radical biochemistry. Brit. Med. Bull. 49, 481-493.
14. DUTHIE, G.G.; WAHLE, K.W.J.; JAMES, W.P.T. 1989. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev. 2:51-62.

15. DUTHIE, G.G. 1999. Determination of activity of antioxidants in human subjects. *Proc. Nutr. Soc.* 58:1015-1024.
16. EVANS, P.; HALLIWELL, B. 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidante status. *Brit. J. Nutr.* 85, Suppl. 2, S67 – S74.
17. FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. 2002. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutr.* 18:872 – 879.
18. HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. 1993. Lipid peroxidation: it's mechanism, measurement and sinificance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:715S-725S.
19. HALLIWELL, B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* 55:S44- S52.
20. HARRIS, E.D. 1992. regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6:2675-2683.
21. HOLBEN, D.H.; SMITH, A.M. 1999. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *J. Am. Diet Assoc.* 99:836-843.
22. HORVATH, A.; MALDONADO, R.; GARCÉS, H.; AUBA, J. 1983. Synovial aldehyde groups in equine joint disease. *Equine Vet. J.* 15(2):168-169.
23. JANERO, D.R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lípido peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9(6):515-540.
24. KIRSCHVINK, N.; DE MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. 2007. The oxidant/antioxidante equilibrium in horses. *Vet.J.* 177:178-191.
25. KOBAYASHI, T.; TSUNAWAKI, S.; SEGUCHI, H. 2001. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Reoprt: Communications in free Radical research* 6: 27-36.
26. KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. 1999. Mittochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 26:463-471.
27. LARKINS, N.J. 1999. Free radical biology and pathology. *J. Equine. Vet. Sci.* 19:84-89.
28. LEFÈVRE, G.; BELJEAN-LEYMARIE, M.; BEYERLE, F.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; CRISTOL, J.P.; THÉRON, P.; TORREILLES, J. 1998. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 56(3):305-319.
29. LETELIER, ME.; PIMENTEL, A.; PINO, P; LEPE, AM.; FAUNDEZ, M.; ARACENA, P.; SPEISKY, H. 2005. Microsomal UDP-Glucuronyltransferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96:480-486.

30. LIN, S.H.; RUSSELL, W.E. 1988. Two Ca<sup>2+</sup>- dependent ATPases in rat liver plasma membrane. J. Biol. Chem. 263:12253-12258.
31. LIU, J.; YEO, H.C.; DONIGER, S. J.; AMES, B.N. 1997. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatograph mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. Anal. Biochem. 245:190-195.
32. LÓPEZ ALONSO, M.; MIRANDA, M.; HERNÁNDEZ, J.; CASTILLO, C.; BENEDITO, J.L. 1997. Glutación peroxidada (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. Arch. Med. Vet. 29:171-180.
33. LOWRY, M.E.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
34. LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. Vet. J. 173: 502-511.
35. MAXWELL, S.R.J. 1995. Prospects for the use of antioxidants therapies. Drugs 49:345-361.
36. MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. J. Dairy Sci. 76:2812-2823.
37. MONDOLA, P.; BIFULCO, M.; SERU, R.; ANELLA, T.; CIRIOLO, M.R.; SANTILLO, M. 2000. Presence of CuZn superoxide dismutase in human serum lipoproteins. FEBS Lett. 467:57-60.
38. MORRISEY, P.A.; O'BRIEN, N.M. 1998. Dietary antioxidants in Elath and disease. Int. Dairy. J. 8:463-472.
39. MOSLEN, M.T. 1994. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Adv. Exp. Med. Biol. 366: 17-27.
40. MÜLLER, A. 2008. Efecto del ácido hialurónico, condroitín sulfato y líquido sinovial obtenido de la articulación metacarpo falángica equina normal y con daño crónico sobre la lipoperoxidación *in vitro*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.Chile, Fac.Cs. Veterinarias y Pecuarias. 48p.
41. MUDWAY, I.S.; KELLY, F.J. 2000. Ozone and the lung: a sensitive issue. Mol. Asp. Med. 21: 1-48.
42. PAZ, M.A.; BLUMENFELD, O.O., ROJKIND, M.; HENSON, E.; FUEFINE, C.; GALLOP, P.M. 1965. Determination of carbonyl compounds with N – Methyl Benzothiazolone Hidrazone. Arch. Biochem. Biophys. 109: 548 – 559.
43. PÉREZ, P.L.; PÉREZ, J.L. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit. 29(3):192-8.

44. POWERS, S.K.; LENNON, S.L. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 58:1025-1033.
45. RAHMAN, I. 2005. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat. Respi. Med.* 4: 175-200.f
46. ROBERFROID, N.; CALDERÓN, P.B. 1993. Definitions, properties and reactions of radicals. En: Roberfroid, M.; Calderón, P.B. (Eds), *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*. Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 91-141 (Capítulo III).
47. SAWICKI, E.; HAUSER, T.R.; STANLEY, T.W. 1961. The 3 – Methyl – 2 Benzothiazolone Hidrazone test. *Anal. Chem.* 33: 93 – 96.
48. SIES, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* 91, 31S-38S.
49. SORG, O.2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C.R. Biol.* 327:649-662.
50. VALENZUELA, A. 1991. The Biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* 48(4):301-309.
51. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
52. VILLASANTE, A.; ARANEDA, O.F.; BEHN,C.; GALEGUILLOS, M.; ADARMES, H. 2009. Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. *Vet. Res. Commun* (en edición).
53. WANG, X.; QUINN, P.J. 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Progress Lipid Res.* 38:309-336.
54. WINROW, V.R.; WINYARD, P.G.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. 1993. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Brit. Med. Bull.* 49: 506-522.
55. YU,B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162.