

## Tesis de Posgrado

# Metabolismo de hidroperóxidos en células tumorales

Bustamante Pilone, Juanita

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Bustamante Pilone, Juanita. (1991). Metabolismo de hidroperóxidos en células tumorales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2415\\_BustamantePilone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2415_BustamantePilone.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bustamante Pilone, Juanita. "Metabolismo de hidroperóxidos en células tumorales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2415\\_BustamantePilone.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2415_BustamantePilone.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

· : : : :  
: . . . .  
**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**METABOLISMO DE HIDROPEROXIDOS  
EN CELULAS TUMORALES**

Juanita Bustamante Pilone

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Marcelo Dankert  
Co-director: Dr. Alberto Boveris

**1 9 9 1**

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas  
División Físicoquímica,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica,

e

Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
y Fundación Campomar  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*Tesis  
2415.  
ej. 2*

*Nothing in the world  
can take the place of persistence:  
talent will not  
Nothing is more common than  
unsuccessful men with talent  
Genius will not,  
unrewarded genius is  
almost a proverb  
Education alone will not.  
The world is full of educated  
derelicts.  
Persistence and determination  
alone are omnipotent. (Anonymous)*

*a Daniel*

*y a Nicolás*

Los experimentos realizados en esta tesis han sido publicados y enviados para su publicacion como se detalla a continuacion:

1. Adryamicin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells  
Bustamante J. Galleano, M., Medrano, E. y Boveris, A.  
Breast Cancer Research and treatment. 17: 145-153, 1990.
2. Melanin content and hydroperoxide metabolism in human melanoma cells.  
Bustamante, J., Guerra, L., Bredeston, L., Mordoh, J. y Boveris, A.  
Experimental Cell Research. 196 (in press) 1991
3. Melanin effect in the lipoperoxidation initiated by free radical generation systems.  
Bustamante, J., Bredeston, L., Malanga, G., Mordoh, J. y Boveris, A.  
Manuscrito enviado para su publicacion a Biochim. Biophys. Acta.
4. Selenium effect on the antioxidant enzyme levels in adrenal cell cultures.  
Bustamante, J., Bredeston, L., Medrano, E. y Boveris, A.  
Manuscrito en preparacion

Quiero agradecer a la Facultad de Farmacia y Bioquímica y al Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Quiero agradecer al Dr. Alberto Eoveris por haberme dado la oportunidad de realizar el Doctorado bajo su dirección, por sus críticas claras y directas y por el apoyo que me ha brindado siempre para continuar con mi carrera científica.

Al Dr. Marcelo Dankert por la tolerancia que tuvo durante mis primeros años de migración y sus meticulosas enseñanzas en el campo de los azúcares.

A la Dra. Juanita Tandecarz por su importante consejo que no seguí, pero que recuerdo en los momentos complicados.

Al Dr. Armando Farodi por el ejemplo que me ha dado en el campo de la investigación y por la amistad que me ha brindado.

A la Dra Estela Medrano y al Dr. José Mordoh sin cuya colaboración hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a Cecilia Giulivi por sus objetivas opiniones las cuales obtuve afectuosa y espontaneamente. Tambien a todos mis compañeros de la cathedra de Fisicoquimica, en especial a Silvia Lores y a Luis Bredeston.

A Mady, Guillermo y Geronimo cuya compañía ha sido definitiva para continuar con los objetivos trazados.

A mis hijos Daniel y Nicolas quienes han tenido que tolerar mi ausencia e impaciencia durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero darle las gracias al Dr. Adalberto Ferrotta.

# INDICE



|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMEN</b>   | 1  |
| <br>   |    |
| <b>INTRODUCCION</b>  |    |
| 1. Bioquímica del oxígeno  | 5  |
| 1.1. Radicales libres, reacciones en cadena.                                     | 9  |
| 1.2. Toxicidad del oxígeno, especies de oxígeno activo.                          | 10 |
| 1.3. Metabolismo de especies de oxígeno activo.                                  | 10 |
| 2. Efectos tóxicos de las especies de oxígeno activo en los sistemas biológicos. | 13 |
| 2.1. Radical superóxido  | 13 |
| 2.2. Peroxido de hidrógeno   | 15 |
| 2.3. Radical hidroxilo   | 16 |
| 2.4. Oxígeno singulete   | 17 |
| 2.5. Efectos tóxicos   | 19 |
| 3. Sistemas de defensa presentes en los sistemas biológicos.                     | 20 |
| 3.1. Sistemas de defensa enzimáticos   | 23 |
| 3.2. Sistemas de defensa no enzimáticos  | 25 |
| 4. Estrés Oxidativo.   | 27 |
| 5. Cáncer.   | 30 |
| <br>   |    |
| <b>MÉTODOS Y MATERIALES</b>  |    |
| 1. Cultivos celulares.   | 35 |
| 1.1. Células de carcinoma de mama humano, MCF-7.                                 | 35 |
| 1.2. Células de melanoma humano, IIB-MEL-J.                                      | 35 |
| 1.3. Células de zona glomerulosa de corteza adrenal de<br>rata                   | 36 |
| 1.4. Tumores melanóticos.  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| 2. Curvas de crecimiento.  | 38 |
| 3. Obtencion de homogeneizados y sobrenadantes.  | 39 |
| 3.1. A partir de cultivos celulares  | 39 |
| 3.2. A partir de higado de rata.   | 39 |
| 3.3. A partir de tumores melanoticos   | 39 |
| 4. Determinacion del consumo de oxigeno.   | 40 |
| 5. Determinacion de la quimioluminiscencia espontanea en cultivos celulares.   | 40 |
| 6. Determinacion de la actividad de las enzimas antioxidantes.   | 42 |
| 6.1. Superoxido dismutasa.   | 42 |
| 6.2. Glutation peroxidasa.   | 43 |
| 6.3. Catalasa.   | 44 |
| 6.3.1. Metodo espectrofotometrico, UV.   | 44 |
| 6.3.2. Metodo del sulfato de titanio.  | 44 |
| 6.3.3. Metodo polarografico.   | 45 |
| 6.3.4. Tabla de conversion de unidades.  | 46 |
| 6.4. Correccion de los valores obtenidos para las enzimas antioxidantes debido a contaminacion con enzimas eritrocitarias. | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 7. Determinacion de la concentracion en estado estacionario de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> cultivos celulares.                       | 49 |
| 8. Determinacion del efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generado extracelularmente sobre cultivos celulares.                     | 50 |
| 9. Determinacion de las sustancias que reaccionan con acido tiobarbiturico (TBARS).  | 51 |
| 10. Determinacion de melanina  | 52 |
| 10.1 Cultivos celulares  | 52 |
| 10.2 Celulas aisladas  | 53 |
| 10.3 Tumores.  | 53 |
| 11. Determinacion del contenido de Cu total en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral.                                      | 54 |
| 12. Determinacion del efecto de la melanina sobre la lipoperoxidacion en homogeneizados de higado de rata.                             | 54 |
| 12.1. Lipoperoxidacion espontanea  | 54 |
| 12.2. Lipoperoxidacion iniciada por hidropoxido de tert-butilo   | 55 |
| 12.3. Lipoperoxidacion iniciada por 2,2-Azobis(2-amidinopropano) hidrocloreuro.  | 55 |
| 13. Determinacion del efecto de la melanina sobre la actividad de glucosa oxidasa frente a 2,2-Azobis(2-amidinopropano) hidrocloreuro. | 56 |
| 14. Determinacion de proteinas.  | 57 |
| 15. Reactivos.   | 57 |
| 16. Estadistica.   | 58 |

## RESULTADOS

### CAPITULO I.

#### Alteraciones del metabolismo de hidroperoxidos en células de carcinoma de mama (MCF-7).

1. Cultivo de las células en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de selenio. 59
  - 1.1. Efecto de la ausencia de suero sobre el crecimiento celular. 59
  - 1.2. Efecto de la ausencia de suero sobre los niveles de las enzimas antioxidantes. 60
  - 1.3. Efecto de la ausencia de suero sobre la disminución de la actividad de la glutathion peroxidasa. 60
  - 1.4. Efecto de la presencia de Selenio en el medio de cultivo. 62
  
2. Estrés oxidativo inducido sobre cultivos celulares de carcinoma mamario por el antibiótico Adriamicina. 63
  - 2.1. Características morfológicas del cultivo de celular. 63
  - 2.2. Efecto de la adriamicina sobre la proliferación celular. 66
  - 2.3. Efecto de la adriamicina sobre las actividades de las enzimas antioxidantes. 67
  - 2.4. Efecto de la adriamicina sobre el consumo de oxígeno en presencia CN. 68
  - 2.5. Efecto de la adriamicina sobre la concentración intracelular de  $H_2O_2$  en el estado estacionario. 69
  - 2.6. Efecto de la adriamicina sobre la quimioluminiscencia espontánea. 71
  - 2.7. Efecto de la Adriamicina sobre la producción de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS). 71

## **CAPITULO II.**

### **Metabolismo de hidroperoxidos en celulas de melanoma maligno humano.**

1. Caracteristicas de los cultivos celulares. 73
  - 1.1. Heterogeneidad celular y diferencias en el contenido de melanina en distintas fases del cultivo celular. 73
2. Consumo de oxigeno de las celulas en fase exponencial y estacionaria del cultivo celular. 76
3. Concentraciones intracelulares de peroxido de hidrogeno en las celulas en fase exponencial y estacionaria del cultivo. 77
4. Niveles de quimioluminiscencia espontanea en las dos fases del cultivo celular. 78
5. Citotoxicidad del peroxido de hidrogeno en las dos fases del cultivo celular. 79
6. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en las dos fases de crecimiento del cultivo. 80
7. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en tumores melanoticos. 81

## **CAPITULO III.**

### **Efectos antioxidantes de preparaciones de melanina sintetica y tumoral.**

1. Espectro de las preparaciones de melanina. 83

|   |     |
|---|-----|
| 2. Contenido de $Cu^{2+}$ presente en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral.  | 84  |
| 3. Efecto de la melanina tumoral y sintetica sobre la lipoperoxidacion de homogeneizados de higado de rata.   | 84  |
| 3.1. Lipoperoxidacion Endogena  | 84  |
| 3.2. Lipoperoxidacion iniciada por hidroperoxido de tert-butilo.  | 90  |
| 3.3. Lipoperoxidacion iniciada por 2,2- Azobis(2-amidinopropano hidrocioruro)   | 94  |
| 4. Actividades enzimaticas presentes en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral.  | 94  |
| 5. Efecto de las preparaciones de melanina sintetica y tumoral sobre la inhibicion de la enzima glucosa oxidasa por 2,2- Azobis(2-amidinopropano hidrocioruro). | 96  |
| <br><b>CAPITULO IV.</b>   |     |
| <b>Defensas antioxidantes en cultivos primarios de celulas de corteza adrenal de rata.</b>  | 99  |
| 1. Cultivos primarios de celulas de zona glomerulosa de adrenal de rata; observaciones morfologicas.  | 100 |
| 2. Niveles de las enzimas antioxidantes presentes en celulas de zona glomerulosa de corteza adrenal de rata.  | 101 |
| 2.1. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en tejido de zona glomerulosa.  | 101 |
| 2.2. Efecto del suero y del selenio en los niveles de las enzimas antioxidantes   | 103 |

## DISCUSION

1. Consideraciones generales 105
2. Metabolismo de hidroperoxidos en cultivos de células de carcinoma mamario humano. 106
3. Metabolismo de hidroperoxidos en células de cultivo de melanoma maligno humano. 111
4. Efectos de la melanina in vitro. 115
5. Niveles de enzimas antioxidantes en células de corteza adrenal de rata. 129.

**CONCLUSIONES** 132

**BIBLIOGRAFIA** 135

# RESUMEN



Se ha sugerido que algunos xenobioticos utilizados en los procesos de quimioterapia podrian ejercer su efecto toxico a traves de un aumento en la produccion de especies de oxigeno activo. Los resultados obtenidos a traves de las observaciones realizadas sobre celulas de carcinoma de mama humano (MCF-7) muestran que el efecto de las antraciclinas (adriamicina) en concentraciones de  $10^{-7}$  M durante 9 dias ejercen claramente efectos citotoxicos sobre las celulas tumorales, generando una situacion caracterizada por un aumento del 41% en el consumo de oxigeno, un aumento del 71% en los niveles intracelulares de peroxido de hidrogeno en el estado estacionario y un aumento del 91% en los niveles de produccion de sustancias reactivas con acido tiobarbiturico (malondialdehido). Estas alteraciones metabolicas tuvieron como consecuencia un aumento del 91% en la quimioluminiscencia y una serie de modificaciones bioestructurales en las celulas sometidas al estres oxidativo generado por la adriamicina. Algunas de las alteraciones morfologicas observadas, ademas de una inhibicion de la proliferacion celular, fueron: a) una marcada tumefaccion de las celulas y sus organelas, lo cual se tradujo en un aumento del 50% del volumen celular; b) una mayor captacion de colorantes y c) una marcada condensacion de la cromatina. La presencia de adriamicina no tuvo ningun efecto sobre los niveles de las enzimas antioxidantes mientras que la ausencia de suero indujo una disminucion en

los niveles de la enzima glutathion peroxidasa dependiente de selenio ( $2 \pm 0.3$  mU/mg de proteina), los cuales se normalizaron ( $5.8 \pm 0.4$  mU/mg de proteina) por la adición de 10% de suero fetal bovino al medio de cultivo. El selenio por otro lado mostro un efecto inhibitorio sobre la proliferacion celular en concentraciones de 10-50 nM sobre las celulas de carcinoma de mama. Los resultados obtenidos contribuyen con la hipotesis de que las especies de oxigeno activo generados durante el ciclo redox de la adriamicina son los responsables de gran parte de los efectos citotoxicos debidos a esta droga.

Las celulas de melanoma maligno cultivadas en monocapa presentan en la fase estacionaria del cultivo niveles de melanina ( $11.3 \pm 0.6$  ug/ $10^6$  celulas) mayores, comparados con los niveles presentes en la fase exponencial del cultivo ( $4.2 \pm 0.3$  ug/ $10^6$  celulas). De las observaciones realizadas sobre las celulas de melanoma humano con alto contenido de melanina podemos concluir que los niveles de peroxido de hidrogeno en el estado estacionario determinados por equilibrio difusional fueron menores ( $2.1 \pm 0.2$  uM) en comparacion con los obtenidos en el estado exponencial ( $3.3 \pm 0.2$  uM ) se encontro una relacion similar en los valores de quimioluminiscencia espontanea obtenidos durante la fase estacionaria ( $78 \pm 24$  cps/ $10^6$  celulas) y la fase exponencial ( $169 \pm 27$  cps/ $10^6$  celulas). La citotoxicidad del peroxido de hidrogeno generado extracelularmente por el sistema glucosa-glucosa oxidasa, determinado despues de 60

min de exposicion, determino valores de  $IC_{50}$  encontrados para las cultivos en fase estacionaria y exponencial de 0.9 y 2.4 mU/ml de glucosa oxidasa respectivamente. Estos resultados diferenciales entre las dos fases de cultivo se interpretan como consecuencia de la mayor actividad de catalasa en los cultivos en fase estacionaria.

Se realizaron una serie de observaciones in vitro sobre el efecto de preparaciones de melanina sintetica y tumoral obtenida apartir de tumores melanoticos, sobre diferentes sistemas de lipoperoxidacion. Las observaciones realizadas permiten concluir que la melanina puede actuar como eficaz atrapador de radicales alquilo (R·) y peroxilo (ROO·) con inhibicion de 90% y 80% en los procesos de lipoperoxidacion espontaneos para la melanina sintetica y tumoral respectivamente. En los sistemas de lipoperoxidacion iniciados con hidroperoxido de ter-butilo las preparaciones de melanina sintetica produjeron una disminucion de la produccion de sustancias reactivas con acido tiobarbiturico del 43%, mientras que las preparaciones de melanina tumoral no mostraron ningun tipo de efecto. Cuando se inicio la lipoperoxidacion con 2,2,azo,bis-amidinopropano, el cual genera radicales por efecto de la temperatura, las preparaciones de melanina sintetica y tumoral produjeron una inhibicion del proceso de lipoperoxidacion de 73% y 84% respectivamente.

Estos efectos sobre diferentes sistemas pueden explicarse dada la capacidad de la melanina de reaccionar

con radicales del tipo  $RO\cdot$  y  $ROO\cdot$ , dando reacciones de adición-terminación y a la capacidad de quelar iones metálicos ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) catalizadores del proceso de lipoperoxidación. metales impidiendo así la propagación de la cadena de reacción.

La determinación de los niveles de las enzimas antioxidantes en la corteza adrenal de rata y en las células provenientes de cultivos primarios de células de zona glomerulosa de corteza adrenal de rata, permiten sugerir que las condiciones de cultivo en presencia de  $1 \mu M$  de ácido ascórbico no afectan los niveles de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, pero sí afectan los niveles de la enzima glutatión peroxidasa y que el cultivo en ausencia de suero, así como la adición de selenio son capaces de modular los niveles de esta enzima, sin tener ningún efecto sobre la superóxido dismutasa y la catalasa.

# INTRODUCCION

## INTRODUCCION

### 1. Bioquímica del oxígeno.

El oxígeno fue descubierto por Joseph Priestley en 1774; unos años más tarde fue reconocido por Antoine Lavoisier como un elemento indispensable para la vida. Este gas se ha considerado como el elemento vital por excelencia ya que todos los animales obtienen su energía gracias al oxígeno que oxida a las moléculas biológicas durante el proceso de la respiración. El oxígeno constituye el aceptor final del flujo de electrones generado en las membranas mitocondriales durante las reacciones de oxidación-reducción realizadas en la cadena respiratoria mitocondrial produciendo diferencias de potencial transmembrana, las cuales son utilizadas para la síntesis de ATP.

La presión del aire corresponde a 760 mm de Hg, y la presión parcial de oxígeno en el aire corresponde a 159 mm de Hg. En el organismo la tensión de oxígeno en la sangre venosa es aproximadamente 40 mm de Hg (53  $\mu\text{M O}_2$ ), y en los tejidos es de alrededor de 25 mm de Hg (33  $\mu\text{M O}_2$ ) (Dejours, 1977). Apesar del alto contenido de oxígeno en el aire la presión parcial de este en el organismo es de solamente 16% del oxígeno ambiental. Además, dentro de las células existe un gradiente de concentración de oxígeno el cual disminuye en las cercanías de las membranas mitocondriales. Las concentraciones intracelulares de oxígeno se calculan como

del orden de 2-25 mm de Hg . Obviamente los valores menores estan vecinos a la linea de la anoxia (Chance y col., 1979). Cualquier aumento en el suplemento de oxigeno a la celula por pequeño que sea ha sido reconocido desde hace muchos años como toxico para todos los organismos vivos (Lavoisier, 1783; Bert, 1871). En condiciones biologicas de temperatura y presion la molecula de oxigeno se muestra como un compuesto quimicamente inerte, no pudiendo reaccionar directamente con las moleculas biologicas. Asi, la glucosa puede permanecer indefinidamente al aire libre sin oxidarse. Como se explica, entonces, que sea una molecula necesaria para la produccion de energia en los seres vivos ? Y como se explica que siendo una molecula necesaria para la vida sea a su vez toxica ? Nos encontramos entonces frente a una doble paradoja, la cual puede ser resuelta a traves de la estructura electronica de la molecula de oxigeno, y permite explicar no solo su baja reactividad sino tambien los mecanismos que conducen a su toxicidad. Esta baja reactividad del oxigeno explica tambien la riqueza de este elemento en la atmosfera ya que de lo contrario este se habria consumido por la oxidacion de los compuestos organicos impidiendose asi la existencia de vida aerobica en el planeta. A pesar de su baja reactividad el oxigeno reacciona con moleculas organicas y enzimas por procesos bioquimicos que conducen a la formacion de intermediarios altamente reactivos: los intermediarios de la reduccion parcial del oxigeno.

de la toxicidad por irradiación con rayos X en sistemas biológicos. El fenómeno básico es la radiólisis del agua y las reacciones siguientes dependen de la presencia o ausencia de oxígeno (Fig. 1). En ausencia de oxígeno predominan las reacciones de recombinación y en presencia de oxígeno las reacciones en cadena. En los sistemas biológicos las reacciones de propagación de radicales libres ocurren generalmente debido a la captura de átomos de hidrógeno (un electrón y un protón) a expensas de moléculas orgánicas vecinas y a través de la ruptura de un enlace covalente entre un átomo de carbono y un átomo de hidrógeno. A través de estas deshidrogenaciones se generan nuevos radicales, los cuales capturan a su vez nuevos electrones continuando así las reacciones en cadena, la cual se interrumpe por la combinación de dos radicales libres a través de sus electrones no apareados en una reacción de terminación.

El estado de un radical libre es pues en principio inestable y su existencia relativamente efímera, debido a esto no resultan fáciles de poner en evidencia. El oxígeno reacciona extremadamente bien con los radicales libres y por el contrario se muestra poco reactivo en presencia de la mayor parte de las moléculas biológicas.



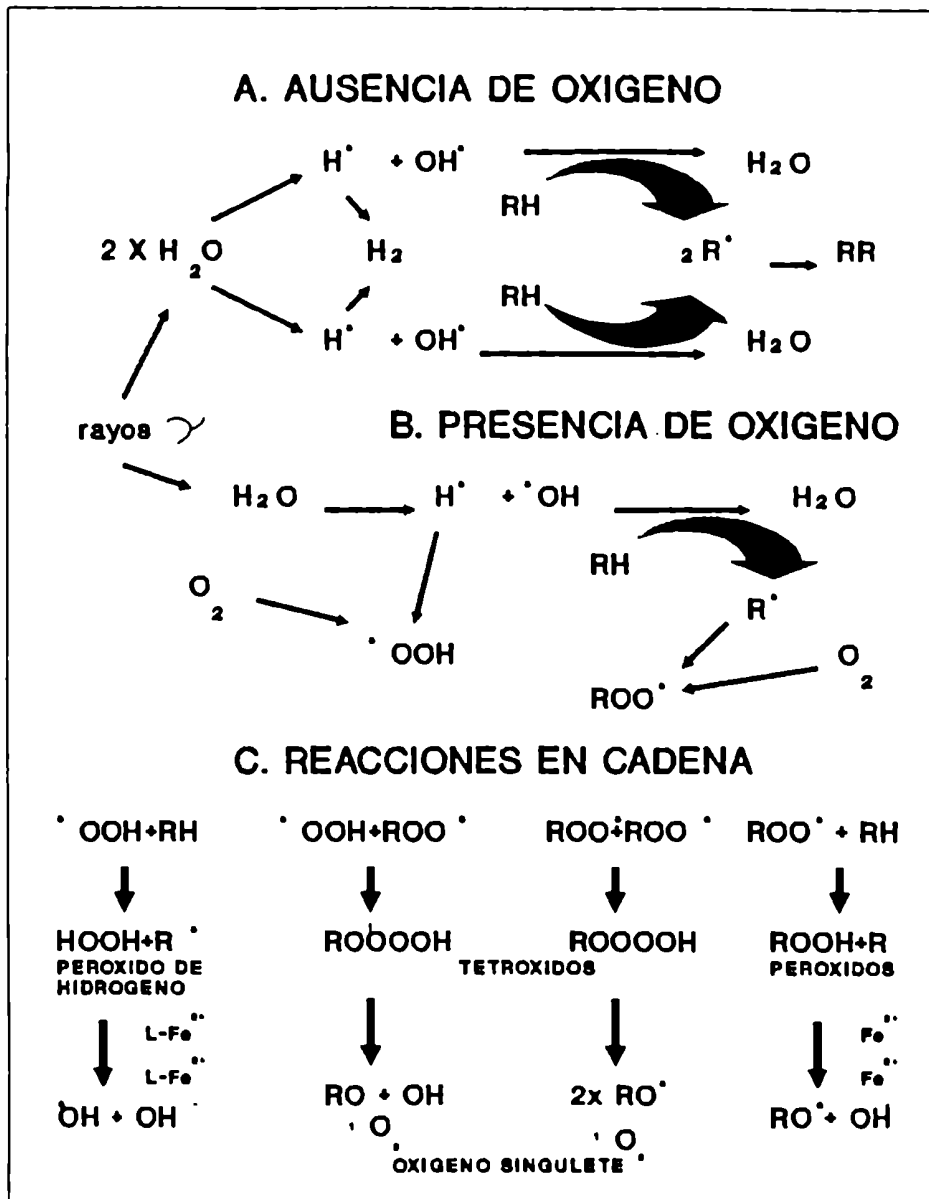


FIG. 1. EFECTO DE LA RADIACION CON RAYOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS. LAS ESPECIES QUÍMICAS PRODUCIDAS POR LA RADIOLISIS DEL AGUA DEPENDEN DE LA PRESENCIA DE OXIGENO; EN AUSENCIA DE OXIGENO LA REACCION SE DETIENE RÁPIDAMENTE POR LA DIMERIZACION DE DOS RADICALES LIBRES. EN PRESENCIA DE OXIGENO SE FORMAN RADICALES OXIGENADOS. LAS REACCIONES EN CADENA SE MANTIENEN POR LA FORMACION DE NUEVAS ESPECIES INESTABLES COMO LOS PEROXILOS Y TETROXIDOS. ESTOS ÚLTIMOS SE TRANSFORMAN EN NUEVAS ESPECIES DE RADICALES OXIGENADOS ADEMAS DE LA ESPECIE ALTAMENTE OXIDANTE, OXIGENO SINGULETE.

## 1.1 Radicales libres y reacciones en cadena.

Un radical libre es un átomo o molécula en el cual existe un electrón no apareado, lo cual le confiere una relativamente alta reactividad llevándolo a la captura de otro electrón. En los radicales libres el momento magnético del electrón no apareado no se encuentra balanceado por el momento magnético de otro electrón en el mismo orbital, lo cual le confiere al radical libre todas sus propiedades paramagnéticas, siendo estas últimas las que permiten poner en evidencia la presencia de los radicales libres por medio de la resonancia electrónica paramagnética.

En el año 1900 el químico alemán M. Gomberg demostró que los radicales libres pueden existir en estado libre y en forma independiente. La reactividad de los radicales libres es proporcional a la incapacidad de deslocalización del electrón no apareado. Así radicales libres de pequeño tamaño molecular como el  $\text{OH}\cdot$  y el  $\text{CH}_3\cdot$  tienen alta reactividad, con constantes de reacción de segundo orden en solución del orden de  $10^9$ - $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Mientras que radicales de mayor tamaño molecular como los derivados del cromoxilo o del trifenilmetano tienen baja reactividad, con constantes de reacción de segundo orden en solución del orden de  $10^1$ - $10^2$  y vidas medias del orden de 1-100 seg en sistemas biológicos. En la década del 50 se dilucidaron los mecanismos químicos

## 1.2 Toxicidad del oxígeno, especies de oxígeno activo.

Alrededor de 1954 Rebeca Gerschman propuso que los efectos tóxicos del oxígeno y de los rayos X en sistemas biológicos tenían un mecanismo en común el cual puede atribuirse a la formación de radicales libres del oxígeno. La transformación del oxígeno en radical libre ocurre por la reducción de la molécula de oxígeno a través de la captación de un electrón, el cual transforma al oxígeno en anión superóxido ( $O_2^-$ ), cuya existencia fue sugerida en 1930 por F. Haber y R. Wellstatter y solamente puesta en evidencia en los sistemas biológicos en 1969 por J.M. McCord y I. Fridovich. Una vez formado el anión superóxido este puede espontáneamente o por la acción de la superóxido dismutasa generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) el cual se transforma fácilmente por ruptura del enlace peróxido (O-O), en especies oxigenadas muy oxidantes como el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ); el cual constituye un tóxico potencial por su alta reactividad química.

## 1.3. Metabolismo de las especies de oxígeno activo y metabolismo de hidroperóxidos.

Se entiende por oxígeno activo a aquellas especies de oxígeno (radicales libres, productos de la reducción parcial del oxígeno y oxígeno singlete) que tienen mayor

reactividad que el oxígeno molecular o dióxígeno. Esta lista incluye naturalmente al anión superóxido ( $O_2^-$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), al radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) y al oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Por extensión son incluidos en esta definición el radical peróxilo ( $ROO^\bullet$ ), los hidroperóxidos orgánicos ( $ROOH$ ) y peróxidos orgánicos ( $ROOR$ ). Esta extensión abarca a las prostaglandinas, algunos pesticidas y tromboxanos que son endoperóxidos e hidroperóxidos. La denominación de metabolismo de hidroperóxidos ( $ROOH$ ) enfatiza en el hecho que estas especies, los hidroperóxidos orgánicos, donde aparte de la molécula ( $R$ ) descarta tanto un ácido graso como una base de ácido nucleico un aminoácido; y son normalmente producidos, utilizados y eliminados en los sistemas biológicos (Chance y col., 1979). Estos procesos metabólicos fueron establecidos en forma general en 1979 por Britton Chance, Helmut Sies y Alberto Boveris (Chance y col., 1979) dando una idea clara, dinámica y general de los procesos de producción de especies de oxígeno activo y de la regulación celular debida a las actividades de los diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos involucrados en la utilización de hidroperóxidos libres y unidos a membranas. En condiciones fisiológicas las reacciones de producción de las especies de oxígeno activo ocurren con velocidades que dan cuenta de un 2-5% del oxígeno que respiramos (Boveris y Cadenas, 1982). Las principales fuentes de peróxido de hidrógeno intracelular en hígado de rata son: las mitocondrias (aproximadamente 20-

35%); el reticulo endoplasmico (NADPH-citocromo-P450-reductasa); (aproximadamente 20- 40%); peroxisomas (aproximadamente 5-30%); y enzimas citosolicas (aproximadamente 1-5%) (Chance y col., 1979). La concentracion en estado estacionario de peroxido de hidrogeno para el higado de rata es de  $10^{-7}$  M (Oshino y col., 1973). Las concentraciones de radical superoxido en higado de rata son del orden de  $10^{-10}$  a  $10^{-11}$  M (Tyler, 1975). Las principales organelas generadoras de especies de oxigeno activo son las detalladas en la Tabla 1.

TABLA 1

## FUENTES INTRACELULARES DE ESPECIES DE OXIGENO ACTIVO

| ORGANELA/ENZIMA                     | PRODUCTOS          |
|-------------------------------------|--------------------|
| Mitocondria                         |                    |
| Ubiquinona                          | $O_2^-$            |
| Reticulo E.                         |                    |
| NADPH citocromo-reductasa           | $O_2^-$ y $H_2O_2$ |
| Citocromo P <sub>450</sub>          | $O_2^-$            |
| Citocromo b <sub>5</sub>            | $O_2^-$            |
| Membrana plasmatica                 |                    |
| Lipoxigenasa                        | $^1O_2$            |
| Prostaglandina                      | $^1O_2$            |
| NADPH-oxidasa (celulas fagociticas) | $O_2^-$            |
| Peroxisomas                         |                    |
| Urato-oxidasa otras                 | $H_2O_2$           |
| Citoplasma                          |                    |
| Enzimas solubles y proteinas        | $O_2^-$ y $H_2O_2$ |
| Tioles y Flavinas reducidas         | $O_2^-$ y $H_2O_2$ |

## 2. Efectos toxicos de las especies activas del oxigeno en los sistemas biologicos.

### 2.1 Radical superoxido

La teoria de la toxicidad del oxigeno propuesta por Gerschman y Gilbert identificaba a los radicales libres del oxigeno como moleculas responsables de esa toxicidad. Mas tarde McCord y Fridovich (1969) al descubrir la superoxido dismutasa propusieron que la formacion de  $O_2^-$  constituye el hecho primordial de la toxicidad del oxigeno y que la superoxido dismutasa constituye la defensa mas importante. A pesar de su baja reactividad quimica en soluciones acuosas y de su poca difusibilidad a traves de membranas biologicas el  $O_2^-$  generado por sistemas enzimaticos, quimicos o fagociticos puede producir dafio biologico considerable. La generacion de  $H_2O_2$  a partir del anion radical superoxido, y el cambio en el estado de oxido-reduccion del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{+2}$  y otros de varios iones metalicos, cobra un significado biologico especial para la celula ya que estas reacciones dan lugar a la formacion de radical hidroxilo el cual es uno de los oxidantes mas poderosos presentes en los sistemas biologicos. Este compuesto es capaz de catalizar diferentes reacciones: la primera reaccion consiste en la oxidacion de grupos -SH a grupos -S-S- (Asada y col., 1976), la segunda reaccion consiste en su dismutacion generando  $H_2O_2$  y  $O_2$ , la tercera reaccion seria su interaccion con metales de

transición como el  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  dando  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$ , la cuarta reacción consistiría en la interacción de los productos de la reacción dos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y tres ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para dar radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) (Kellog y col., 1975) (Fig. 2).

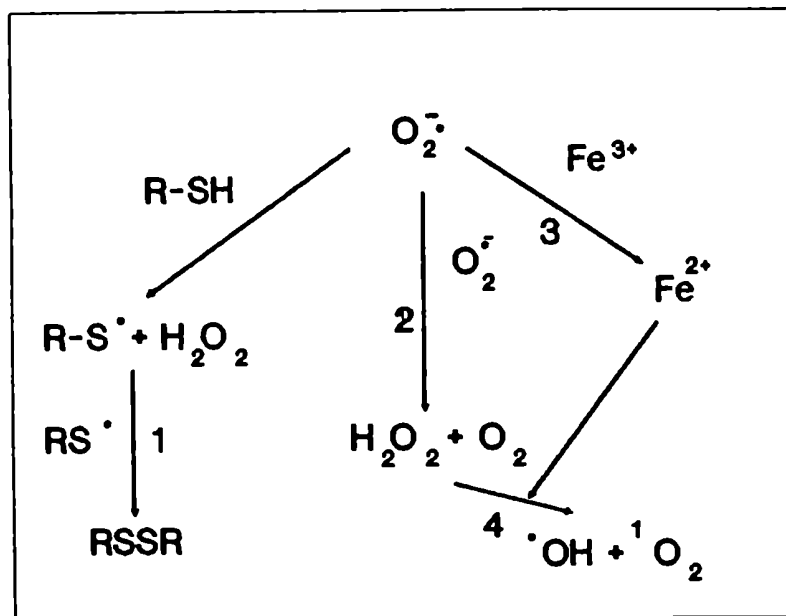
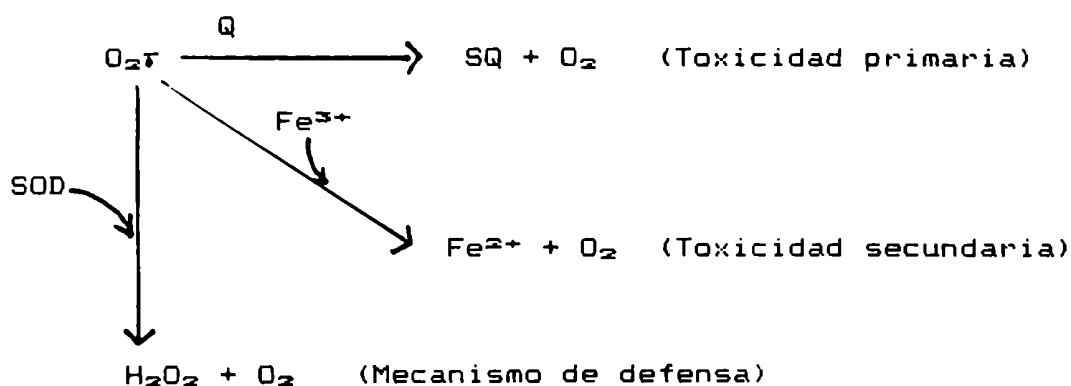


FIG. 2 REACCIONES DEL ANION RADICAL SUPEROXIDO EN LAS CELULAS. (TOMADO DE OBERLEY Y COL 1979)

Estas especies son capaces de producir lipoperoxidación (Oberley, 1978); las tres reacciones pueden traer además consecuencia importantes en el metabolismo celular. Las reacciones que dan origen a una toxicidad directa del anion superóxido no parecen muy importantes en los sistemas biológicos. Estas son las que se dan al reaccionar el anion superóxido directamente con las quinonas, para dar

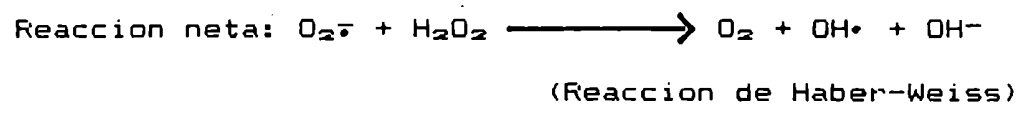
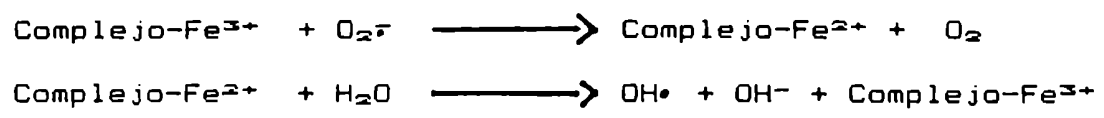
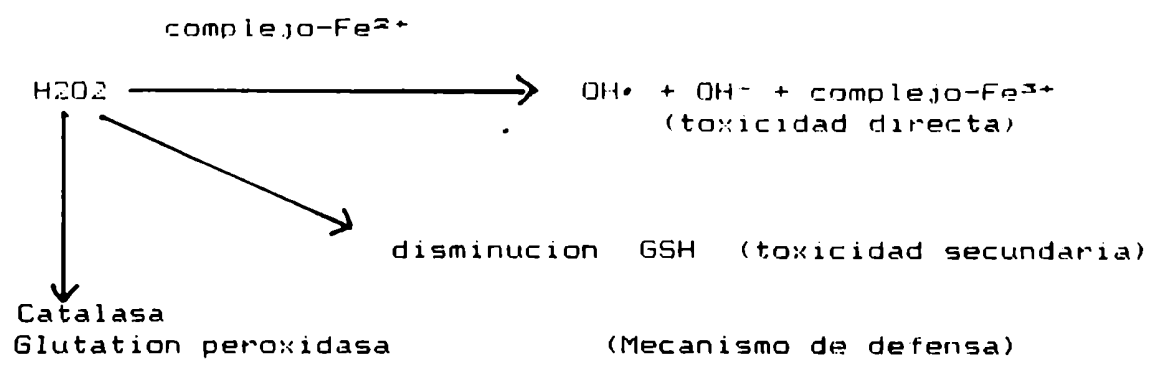
semiquinonas o con citocromo c oxidado para dar citocromo c reducido. Las reacciones que generan toxicidad secundaria aparecen como de gran importancia debido a la reaccion del anion radical superoxido con metales de transicion los cuales se reducen constituyendose asi en los iniciadores de diferentes reacciones en cadena de radicales libres. Como se dijo antes la enzima superoxido dismutasa constituye la defensa mas importante para prevenir los efectos toxicos del anion radical superoxido.



## 2.2. Peroxido de hidrogeno.

El peroxido de hidrogeno se genera en las mitocondrias como en los microsomas por autooxidacion de componentes redox de las membranas y en los peroxisomas por la accion enzimatica de oxidasas como la D-aminoacido-oxidasa, urato oxidasa etc. La molecula de  $H_2O_2$  es altamente difusible (Chance y col., 1979).



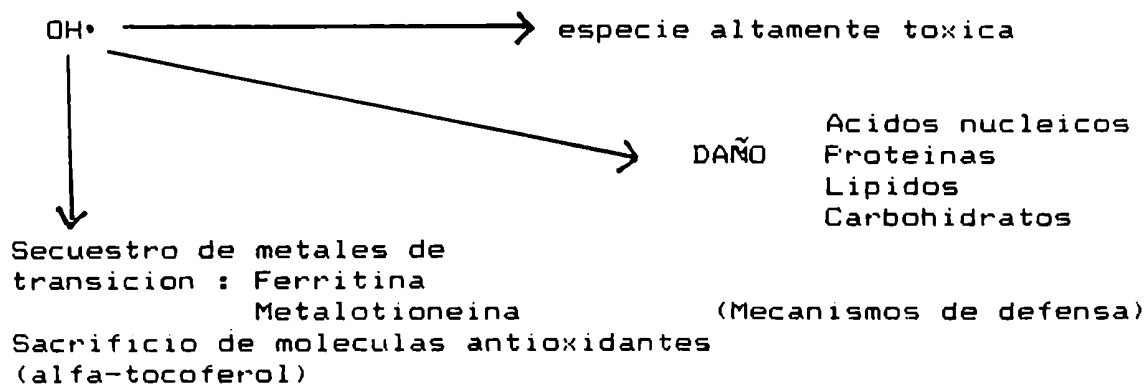


El peroxido de hidrogeno a traves de su interaccion con metales de transicion especialmente Fe<sup>2+</sup> es capaz de generar radical hidroxilo, siendo esta reaccion la principal fuente de toxicidad. La catalasa y la glutacion peroxidasa constituyen los mecanismos de defensa mas importantes.

### 2.3 Radical hidroxilo

Este radical se genera no solo por la reaccion de Haber-Weiss con peroxido de hidrogeno y iones metalicos, sino a traves de procesos de radiacion ionizante. Este radical constituye una especie altamente reactiva y se cree que es responsable de la mayor parte del daño al DNA (Mello Filho y Hoffmann, 1985; Starke y Farber, 1985) generando rupturas y liberacion de bases (Fraga y col., 1990). No obstante el

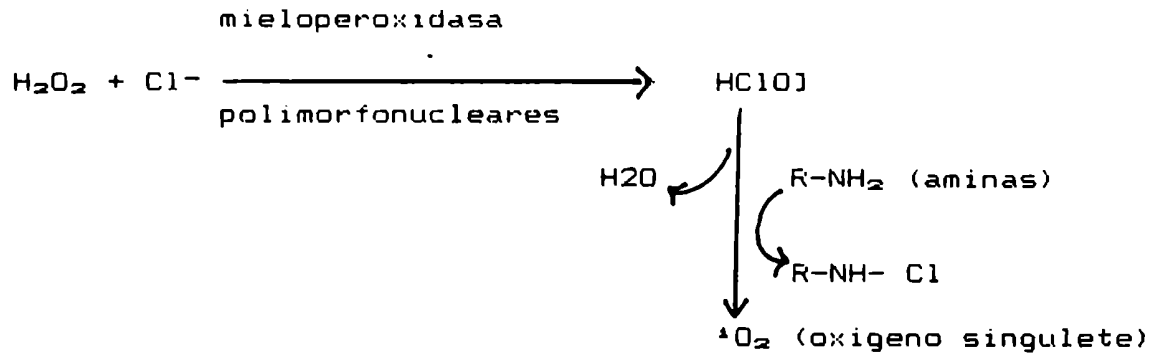
mecanismo de reaccion de estos radicales no es muy claro y se ha propuesto recientemente que la mavoria del daño al DNA, mediado por las especies de oxigeno activo no seria debido a un efecto directo de el radical hidroxilo sobre el DNA sino que estos iniciarian una serie compleja de reacciones metabolicas secundarias en cascada las cuales en parte requeririan de  $Ca^{2+}$  y finalmente se produciria el daño al DNA (Ochi y Cerutti, 1987; Cantoni y col., 1989). El radical hidroxilo es capaz tambien de generar procesos de lipoperoxidacion a los lipidos de las membranas celulares y generar entrecruzamiento y polimerizaciones sobre las moleculas de proteinas.



#### 2.4 Oxigeno singulete.

El oxigeno singulete es un estado exitado del oxigeno molecular. Si bien no es exactamente un radical libre, tiene reactividad aumentada y se forma en reacciones en las que intervienen radicales libres desencadenando a su vez diferentes reacciones en cadena. Se forma tambien en

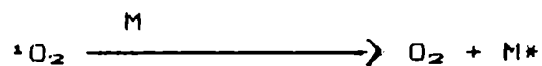
reacciones de fotosensibilización, recombinación de peróxidos provenientes de reacciones de lipoperoxidación y a partir de procesos de fagocitosis (Badwey y Karnovsky 1980).



Esta reacción es biológicamente importante ya que el hipoclorito (HOCl) puede formarse a través de la enzima mieloperoxidasa durante la fagocitosis.



GSH  
 Vitamina E  
 Vitamina C (mecanismos de defensa)  
 Vitamina A



El oxígeno singulete puede interactuar con otras moléculas combinándose químicamente con ellas o transfiriendo su energía de excitación a ellas y volviendo a su estado fundamental y dejando a la otra molécula en estado excitado

(reacciones de fotosensibilización) (Turrens, 1978).

## 2.5. Efectos toxicos.

Las especies de oxígeno activo generadas intra o extra celularmente durante periodos prolongados en concentraciones bajas, generan alteraciones de los mecanismos de respuesta intracelular (Muehlematter y col., 1989; Cerutti y col., 1989), las cuales no llegarían a presentar modificaciones bioestructurales. Estas modificaciones morfológicas si estarían presentes en casos de concentraciones toxicas de especies de oxígeno activo las cuales generarían efectos citotoxicos agudos presentandose así las modificaciones morfológicas (Bustamante y col., 1990). Concentraciones similares de oxígeno activo pueden resultar mas o menos toxicas para las distintas células, dependiendo de un sutil balance entre las concentraciones en el estado estacionario de las especies de oxígeno activo y de las defensas antioxidantes enzimaticas y no enzimaticas celulares (Amstad y Cerutti, 1990).

En general los efectos citotoxicos agudos los cuales se asocian a aumentos de la quimioluminiscencia espontanea del 100% (Fraga y col., 1985), y aumentos de la  $[H_2O_2]$  mayores al 40% (Gonzales Flecha, 1991) llevando a la muerte celular (Tabla 2).

Los efectos de dosis no letales serían difíciles de detectar atraves de biotransformaciones en los sistemas

celulares, pero podrian ser particularmente importantes en los mecanismos inmunologicos (Cerutti y Trump, 1991), donde los oxidantes producidos por las celulas fagociticas podrian estimular el crecimiento, paralelamente a su efecto toxico y bacteriostatico, involucrandose asi en los procesos carcinogenicos donde los oxidantes pueden actuar como promotores tumorales. Que una dosis de oxidante genere transformaciones bioestructurales o genere una respuesta no letal (fisiopatologica) (Tabla 3) no depende solamente de las defensas antioxidantes celulares sino tambien de la eficacia de los mecanismos de reparacion intracelulares que operan sobre el DNA, las proteinas y los fosfolipidos.

### **3. Sistemas de defensa presentes en los sistemas biologicos**

La toxicidad del oxigeno se ejerce en los sistemas biologicos en las condiciones patologicas y posiblemente en condiciones que contribuyen al proceso de envejecimiento, Estas acciones toxicas estan contrarrestadas por los sistemas protectores enzimaticos que incluyen la superoxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y los sistemas no enzimaticos constituidos por moleculas pequenas como el acido ascorbico, el alfa-tocoferol, el glutatión, el beta-caroteno y el acido urico.

TABLA 2

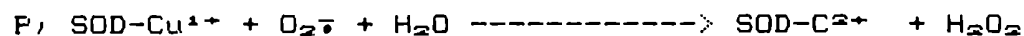
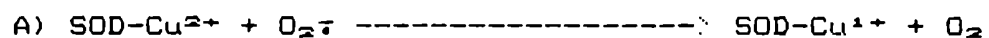
## EFECTOS CITOTOXICOS DE LAS ESPECIES DE OXIGENO ACTIVO

 $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ,  $^1O_2$ 

| Efectos  | Observaciones   |
|--|---|
| Inhibicion de bombas ionicas                         | tumefaccion citoplasmatica<br>captacion de colorantes<br>(trypan blue)  |
| Perdida de la homeostasis<br>del $Ca^{+2}$           | ruptura del<br>citoesqueleto<br>aparicion de ampollas<br>(blebbing)<br>tumefaccion de<br>mitocondrias<br>condensacion de la<br>cromatina      |
| Daño a proteina que unen<br>metales (metalotioneina) | liberacion de calcio  |
| Daño a membranas                                     | lipoperoxidacion<br>(productos) TBARS<br>perdida de proteinas<br>(LDH)<br>evidencia<br>ultraestructural<br>de daño a membranas                |
| Daño a DNA   | liberacion de<br>metabolitos<br>(8 OH deoxiguanosina)<br>S.C.E. (intercambio de<br>cromatides hermanas)<br>otras aberraciones<br>cromosomicas |

no saturable y no Michaeliana con una constante de velocidad de segundo orden para  $O_2^-$  y [SOD] de  $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  (Chance y col., 1979).

La enzima citosolica (Cu-Zn SOD) y la mitocondrial (Mn-SOD) estan formadas por dos subunidades con dos atomo-gramo de Cu y dos atomo-gramo de Zn por molecula y dos atomo-gramo de Mn respectivamente.



La glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa constituyen el segundo sistema de defensa antioxidante celular. La glutatión peroxidasa en su mayor parte citosolica presenta dos formas dependiente y no dependiente de selenio (Chance y col., 1979).

La enzima dependiente de selenio reduce no solamente al peroxido de hidrogeno sino tambien a los hidroperoxidos organicos en presencia de glutatión, dando este dos equivalente de reduccion y formando a su vez glutatión oxidado (GSSG) transformando una molecula de  $H_2O_2$  en dos moleculas de  $H_2O$ , el glutatión es regenerado a su vez por la glutatión reductasa en presencia de NADPH (Flohe, 1982)

TABLA 3

ALTERACION DE LOS MECANISMOS DE RESPUESTA DEBIDOS A LAS  
 ESPECIES DE OXIGENO ACTIVO  
 $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $^1O_2$

---

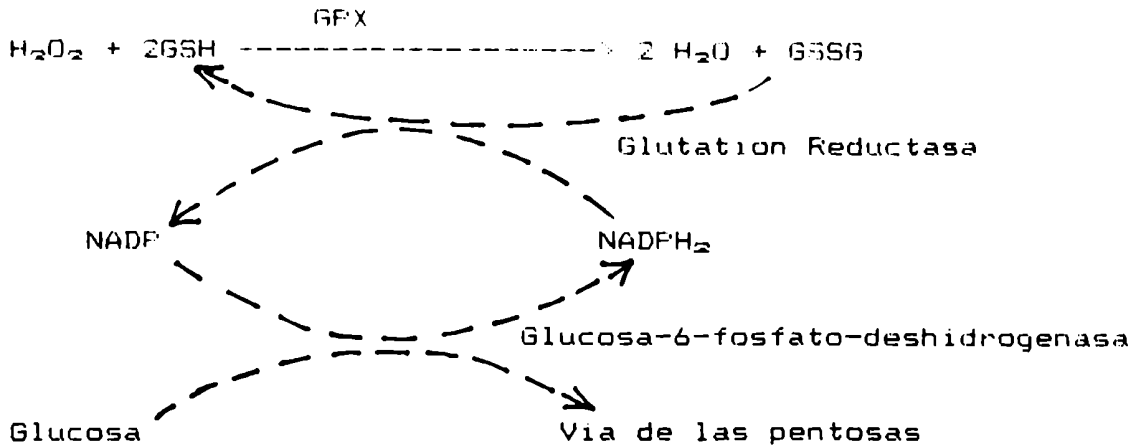
Leve aumento de la concentracion de  $Ca^{2+}$  intracelular  
 Fosforilacion de proteina ribosomal S-6  
 Activacion de protein-quinasa C (CPK)  
 Daño al DNA  
 Poli-ADP-ribosilacion de proteinas y de acidos nucleicos  
 Expresion de oncogenes c-fos y c-myc  
 Modulacion de la expresion genica.

---

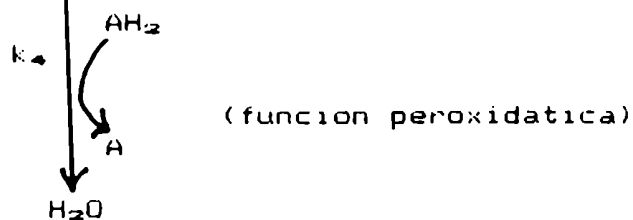
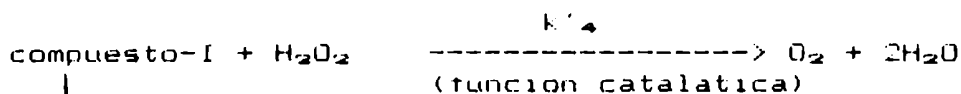
### 3.1 Sistemas enzimaticos

La superoxido dismutasa se encuentra presente en practicamente todas las celulas eucarioticas como levaduras, plantas y animales (Halliwell y Gutteridge, 1989). Esta enzima cataliza la dismutacion del  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  a traves de una reaccion de dismutacion en la cual dos moleculas del mismo sustrato interaccionan secuencialmente una oxidandose (perdida de electrones) y otra reduciendose (ganancia de electrones). La reaccion presenta una cinetica



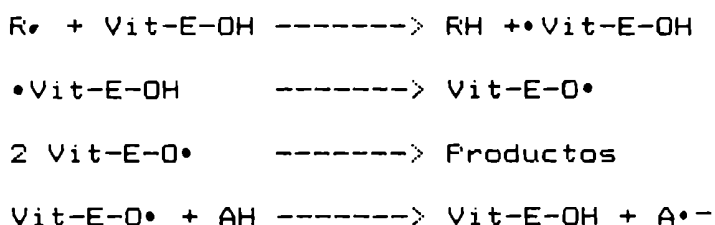


La catalasa se encuentra en su mayor parte en los peroxisomas (De Duve, 1973), esta enzima es no saturable y no Michaeliana y dismuta el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  molecular. Tiene dos actividades enzimáticas bastante diferentes una actividad catalítica y otra actividad peroxidática (ver esquema). La eficiencia de las dos vías depende de la constante de velocidad y de la concentración del dador de hidrogeno ( $\text{AH}_2$ ). Como dador de hidrogeno pueden actuar sustratos como el metanol, etanol, fenol, ácido fórmico, nitritos, otros.  $K_1: 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $K'_4: 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $K_4: 0.2-1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Chance y col., 1979).

$$k_1$$


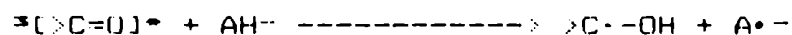
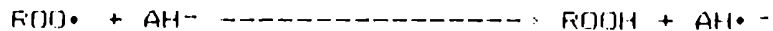
### 3.2 Sistemas de defensa no enzimaticos

La vitamina E o alfa-tocoferol es capaz de reaccionar con distintos radicales libres a velocidades muy diferentes dando el correspondiente radical (vit-E---O•). Se ha propuesto que esta molecula podria funcionar como un canal molecular a traves del cual los radicales libres abandonarían la zona de hidrocarburo (hidrofobica) de las membranas de la siguiente forma:



Los antioxidantes (AH) podrian ser acido ascorbico, acido urico, serotonina u otros hidroxindol derivados (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El acido ascorbico parece estar involucrado en la transferencia de H al alfa-tocoferol regenerando la forma reducida de la Vit-E, en la reaccion directa con radicales peroxilos y tambien como apagador de la energia de desexcitacion del  $^1\text{O}_2$  (Halliwell y Gutteridge, 1989). Con los carbonilos excitados en estado triplete promueve la abstraccion de H apartir de sus grupos enediol (Halliwell y Gutteridge, 1989).



El glutatión se encuentra en concentraciones de 2-7 mM en las células, además de ser sustrato importante de la glutatión peroxidasa y de la dehidroascorbato reductasa, es un buen atrapador de radicales hidroxilo y de oxígeno singlete; también es capaz de reactivar algunas enzimas inhibidas por concentraciones altas de oxígeno debido posiblemente a la oxidación de los grupos -SH de esas proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El ácido úrico se acumula en los tejidos de los mamíferos como producto final del metabolismo de las purinas y se encuentra en el plasma en concentraciones de 0.25-0.45 mM. Esta molécula a pesar de funcionar como un eficiente atrapador de oxígeno singlete, de radicales peróxilos ( $ROO\cdot$ ) y de radicales hidroxilos ( $OH\cdot$ ) no es siempre un perfecto antioxidante, dado que el radical en que se transforma aunque menos reactivo que el radical hidroxilo no es completamente inofensivo ya que puede producir inactivación de algunas enzimas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La vitamina A es capaz de captar la energía de desexcitación del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Di Mascio y col., 1990) también puede funcionar como atrapadora de radicales libres (Burton e Ingold, 1984)

Es importante anotar que estos componentes son importantes en las células de los organismos vivos ya que gran parte de las propiedades anticarcinogénicas de los antioxidantes pueden ser atribuidas a sus habilidades como atrapadores de radicales libres. Los antioxidantes presentes en las fracciones citosólicas o en los fluidos extracelulares así como aquellos localizados en los lípidos de las membranas actúan como anticarcinógenos interrumpiendo las reacciones de radicales libres potencialmente responsables de los procesos de carcinogénesis.

#### **4. Estados celulares prooxidantes**

La mayor parte de los organismos vivos se encuentran expuestos a los oxidantes; los oxidantes endógenos son aquellos que se generan durante las reacciones metabólicas y los oxidantes exógenos incluyen al oxígeno hiperbárico, a una gran variedad de xenobióticos y a la radiación.

Un estado celular pro-oxidante o estrés oxidativo se genera cuando las defensas antioxidantes no pueden contrarrestar el flujo de los oxidantes y se produce un aumento en las concentraciones en el estado estacionario de las especies de oxígeno activo. Esto puede ocurrir por una producción aumentada de las especies activas del oxígeno o por una disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas o por combinación de las dos situaciones. El daño ocasionado a las macromoléculas dentro de la célula

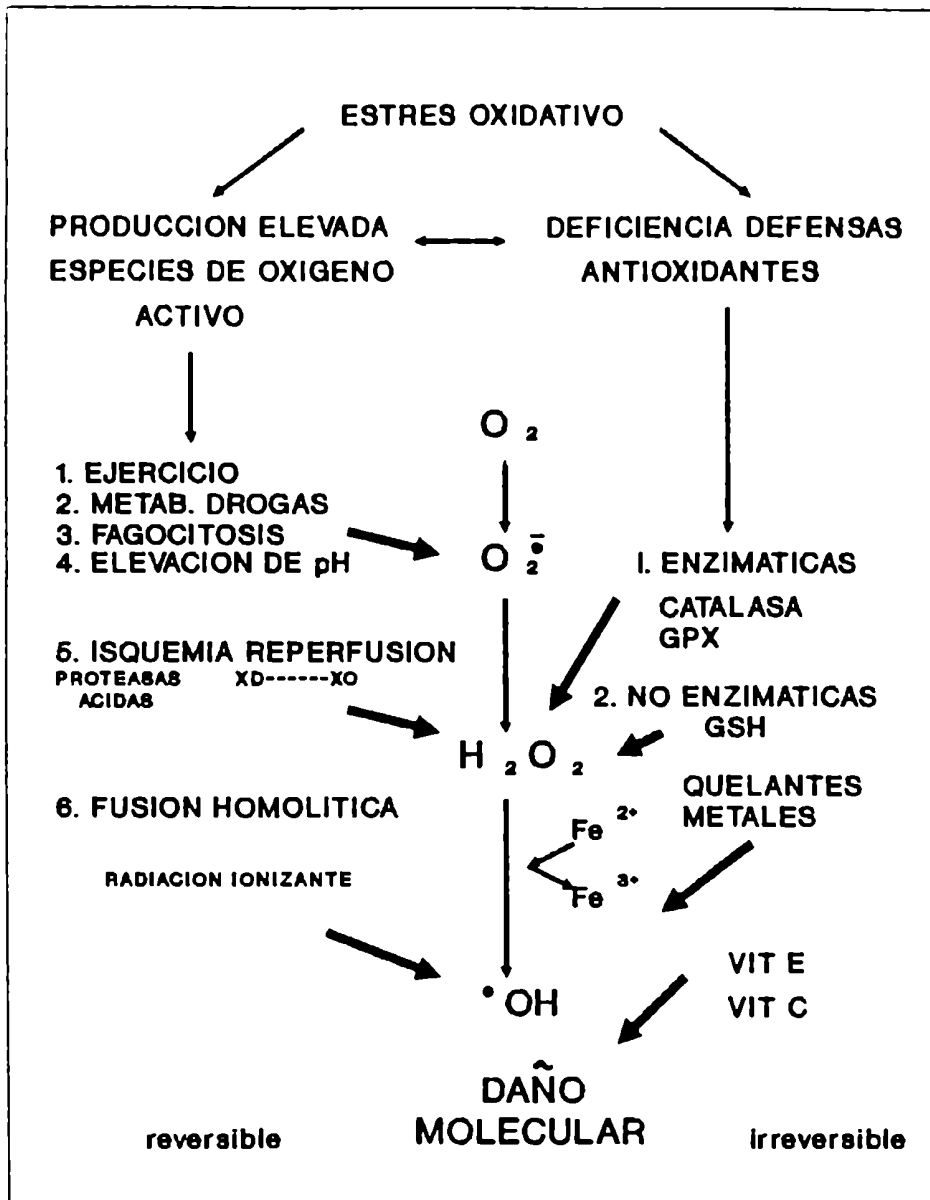


FIG.3. ESTRES OXIDATIVO. SE ORIGINA POR UN AUMENTO EN LA PRODUCCION DE LAS ESPECIES OXIDANTES O POR UNA DISMINUCION DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES O POR COMBINACION DE LAS DOS SITUACIONES. DANDO LUGAR A DAÑO DE MACROMOLECULAS; ESTE PUEDE SER REVERSIBLE O NO DEPENDIENDO DE LAS CONCENTRACIONES Y DEL TIEMPO DE EXPOSICION A ESTOS AGENTES.

**CONSECUENCIAS DEL DAÑO  
MOLECULAR DEBIDO A  
LAS ESPECIES DE OXIGENO ACTIVO**

**CARBOHIDRATOS**      **—————>**      **ARTRITIS**

FRAGMENTACION DE POLISACARIDOS (NAN-NAG)  
DESPOLIMERIZACION  
DAÑO A LIGAMENTOS Y ARTICULACIONES

**LIPIDOS**      **—————>**      **ATEROSCLEROSIS**

PRODUCTOS TOXICOS  
QUIMIOTAXIS  
DAÑO ENDOTELIAL

**PROTEINAS**      **—————>**      **E. AUTOINMUNES**

PRODUCCION DE ANTIGENOS NUEVOS  
MODIFICACIONES DE RESIDUOS DE LISINA

**A. NUCLEICOS**      **—————>**      **ENVEJECIMIENTO**

DAÑO BASES Y AZUCAR      **CANCER**  
RUPTURA SIMPLE CADENA  
RUPTURA DOBLE CADENA  
aberraciones cromosomicas

**Alteracion de la respuesta celular**

**MODULACION DE LA EXPRESION GENICA**

FIG. 4. ENFERMEDADES CUYA RELACION CON ESPECIES DE OXIGENO ACTIVO COMO AGENTES CAUSALES YA HA SIDO ESTABLECIDA.

puede tener consecuencias reversibles o irreversibles dependiendo de las concentraciones de las especies de oxígeno activo y del tiempo de exposición a estos agentes (Fig 3). En la Fig 4 se presentan algunas enfermedades en las cuales la evidencia del involucramiento de las especies del oxígeno activo como agentes causantes parece establecida (Halliwell y Gutteridge, 1989).

## 5. Cancer

El proceso de conversión de una célula normal hacia un estado maligno se llama carcinogénesis y consiste en un proceso complejo multiseccional donde los factores que lo desencadenan incluyen tanto características genéticas como factores ambientales y los agentes que lo inducen se llaman carcinógenos. Las células malignas así generadas difieren bioquímicamente en muchos aspectos de las células normales. Uno de los primeros puntos analizados en estas células cancerosas en relación con el metabolismo de hidropéroxidos fue el contenido de las defensas antioxidantes enzimáticas ya que protegían contra los metabolitos de la reducción parcial del oxígeno. Estas especies ( $O_2\cdot^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH\cdot$ ) se encuentran implicados en el daño producido por la radiación y por diferentes compuestos citostáticos, involucrando así a las especies de oxígeno activo en la sensibilidad de estas células a la radioterapia y a la quimioterapia.

yamanaka y Deamer (1974) fueron los primeros en demostrar que una de las enzimas antioxidantes, la superoxido dismutasa se encontraba en concentraciones menores a las de las células normales. Hallazgos posteriores mostraron que en un gran número de células tumorales existían niveles disminuidos de Mn-SOD y que un número importante de tumores mostraban valores levemente disminuidos de Cu-Zn-SOD (Bozzi y col., 1976; Peskin y col., 1976, 1977; Lankin y col., 1976; Oberley y col., 1978). Dado que la Mn-SOD es de localización mitocondrial estas observaciones podrían resumirse refiriéndose a la menor capacidad oxidativa de las células tumorales.

Si bien estos hallazgos son ciertos, Marklund y col. (1982) analizaron el contenido de enzimas antioxidantes en diferentes líneas tumorales humanas comparándolas con tejidos humanos normales y encontraron que el contenido de la Mn-SOD no se encontraba como regla general disminuida en las células tumorales y si presentaba una variación mayor que la Cu-Zn-SOD; también observaron que la catalasa variaba considerablemente tanto en los tejidos normales como en las líneas tumorales mientras que la glutatión peroxidasa mostraba pocas diferencias entre los tejidos tumorales y normales.

Dionisi y col. (1975) mostraron que las células tumorales de Ehrlich tenían la misma velocidad de producción de radical superoxido ( $O_2\dot{\bar{r}}$ ) que células de corazón bovino, mientras que las células de hepatoma de Morris presentaban



una velocidad de producción de radical superóxido 5 veces mayor que otros tipos celulares. Estas investigaciones solo pudieron concluir que las células tumorales son capaces de producir radical superóxido.

Mucho se ha especulado respecto a la reacción del radical superóxido con la oxidación de los grupos sulfidrilos a grupos disulfuros en el sentido de que este proceso puede llevar a cambios conformacionales de diferentes proteínas generando activaciones o inactivaciones de algunas enzimas de acción crítica. Los resultados experimentales señalan que es posible modificar a través de los cambios del estado redox de los tioles celulares las actividades de enzimas como la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa, estas dos enzimas están involucradas en la regulación de los niveles de AMP cíclico, el cual tiene un papel importante en la regulación de la división celular (Friedman, 1976). Apffel y col. (1972) encontraron que la proliferación de algunos tumores, dependía de un intercambio entre los grupos tioles y los grupos disulfuros. Se ha especulado que el radical hidroxilo a través de la activación de la guanilato ciclasa (Mittal y col., 1977) la cual regula a su vez los niveles de GMP cíclico es capaz de aparecer como regulador de la división celular. Hallazgos posteriores han demostrado que las fracciones subcelulares obtenidas a partir de células tumorales en cultivo u obtenidas a partir de tumores de animales presentan niveles muy bajos de lipoperoxidación in vitro. Entre las razones de este fenómeno podríamos señalar

a la disminucion del contenido de los acido grasos poliinsaturados en las membranas de las celulas tumorales, a aumentos en el alfa-tocoferol y a una caida de los niveles de cit.P450 y de la NADPH-cit-P450-reductasa (Halliwell y Guytteridge, 1989). Varios estudios recientes sugieren que las reacciones de radicales libres se encuentran disminuidas en las celulas tumorales (Halliwell y Gutteridge, 1989)

Uno de los objetivos importantes de conocer el metabolismo de hidroperoxidos en las celulas tumorales seria el diseño de drogas cuyo destino sea lograr la muerte de las celulas cancerosas con el minimo daño posible hacia las celulas normales. Los tumores poseen una capacidad proliferativa importante en comparacion con las celulas originales normales, por consiguiente un gran numero de drogas se ha diseñado para interferir con la division celular, a menudo bloqueando la sintesis de DNA, RNA o proteinas. Los primeros ensayos de quimioterapia se hicieron en el año 1942 cuando se uso por primera vez mostaza nitrogenada (Halliwell y Gutteridge, 1989) en un paciente con linfoma. Hoy en dia los agentes alquilantes se utilizan para unirse al DNA modificandolo e interfiriendo con la replicacion y transcripcion. Se usan tambien antimetabolitos los cuales interfieren con diferentes reacciones metabolicas como el metrotexate, el 5-fluoro-uracilo, 6-mercaptopurina etc. Existen tambien un numero grande de antibioticos antitumorales los cuales se pueden clasificar desde el punto de vista quimico en diferentes grupos. Asi como las

antraciclinas producidas por diferentes cepas de Streptomices poseen una porcion de carbohidrato unida a su estructura tetraciclica, la perdida de este azucar significa la perdida de su actividad tumoral. Entre las antraciclinas se encuentra la ampliamente usada doxorubicina, a menudo llamada adriamicina. Las antraciclinas producen una serie de efectos colaterales siendo el mas serio su cardiotoxicidad, esto constituye un limitante importante en la dosis administrada. El mecanismo de accion no esta totalmente claro y parece involucrar diferentes procesos en los cuales parece que la produccion de radicales libres del oxigeno juega un papel importante (Bachur y col., 1978; Bustamante y col., 1990). Entre las celulas tumorales existen diferencias importantes en el grado de resistencia a la radiacion ionizante; las celulas de carcinoma mamario muestran una sensibilidad diferente a las celulas de melanoma, presentando estas ultimas una resistencia importante a la radioterapia.

El objetivo de esta tesis es el de examinar las caracteristicas generales del metabolismo de hidroperoxidos en dos lineas de celulas tumorales humanas en cultivo: las de carcinoma de mama (MCF-7) y las de melanoma maligno (IIB-MEL-J) y estudiar algunas acciones de agentes antioxidantes y drogas antitumorales cuyo efecto biologico parece ejercerse a traves de la generacion de las especies del oxigeno activo.

# METODOS Y MATERIALES

## **1. Cultivos celulares.**

Se utilizaron dos líneas celulares tumorales MCF-7 y IIB-Mel-J, ambos tipos de células constituyen líneas tumorales establecidas.

Las monocapas de células adrenales se obtuvieron a partir de cultivos primarios de células de la corteza adrenal de rata.

### **1.1. Cultivo de células de carcinoma mamario MCF-7.**

Esta es una línea celular no clonada establecida a partir de un carcinoma de mama humano, obtenida originalmente en la Michigan Cancer Foundation (Detroit, Mi. USA). Estas células se cultivaron en una mezcla de Dulbecco/F12 (1:1) suplementada con insulina (10 µg/ml), glutamina (4 mM), estreptomycin (50 µg/ml), penicilina (50 unidades/ml), y 10% de suero fetal. En algunos experimentos (indicados en el texto) se reemplazó el suero fetal por albumina bovina (1 mg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> (Resnicoff y Medrano, 1987).

### **1.2 Cultivo de células de melanoma maligno IIB-MEL-J.**

Esta línea celular se obtuvo a partir de un nódulo proveniente de una metástasis de pulmón de un melanoma maligno de un paciente de 64 años (Guerra y col., 1989). Después de la disgregación del tumor con colagenasa las células se purificaron con un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células de la interfase se aspiraron y se cultivaron en Dulbecco/F12 (1:1) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), insulina (5 ng/ml), factor de crecimiento epitelial (EGF) (5 ng/ml), glutamina (30 mg/ml), piruvato de sodio (0.15 mg/ml), galactosa (0.3 mg/ml), transferrina (5 µg/ml), selenito de sodio (20 nM) y ácido ascórbico (100 µM) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Estas células se separaron en 4 subpoblaciones a través de gradientes de densidad en Percoll (Guerra y col., 1989).

### **1.3. Células de corteza adrenal.**

Cada cultivo se preparó a partir de tejido obtenido de glándulas adrenales de ratas Wistar de 200 g (8-9 semanas), a las cuales se les dio KCl 0.3 M en dextrosa al 5% durante 72 horas antes de matarlas (Hornsby y col., 1971). Luego de extraer las adrenales en forma estéril se procedió a la decapsulación de la glándula adrenal. Una vez obtenidas las capsulas se colocaron en una solución de sales de Hank-25 mM

Hepes. La solución estaba constituida por: 0.595% Hepes, 0.035%  $\text{NaHCO}_3$ , 0.976% de sales de Hank; 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina, 20 nM de Selenito de sodio y 1  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico. Enseguida se procedió a raspar suavemente el tejido adrenocortical del resto de la glándula utilizando un bisturí; los fragmentos de tejido así obtenidos se colocaron en 5 ml de solución de Dulbecco/F12 (1:1) en solución amortiguadora de bicarbonato con 15% de suero fetal bovino y se disgregaron durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  por la adición de 2mg/ml de colagenasa. Al final de la incubación se aspiró el medio y se resuspendió el material en medio Dulbecco/F12 10% de suero fetal suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico. Después de pipetear varias veces con pipeta Pasteur se centrifugaron las células a 800 g; este material se resuspendió parte en medio de congelación: 1.7 ml de medio Dulbecco/F12, 0.2 ml de suero fetal bovino, 0.1 ml de DMS (sulfoxido de dimetilo) y en parte se resuspendió suavemente en medio Dulbecco/F12, 10% de suero fetal suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico, estreptomina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), y penicilina (50 unidades/ml) y se colocó en la estufa a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Dada la fragilidad de estas células es necesario una revisión diaria de las placas al microscopio con el fin de observar su crecimiento. Se les cambió el medio de cultivo a las 30 horas de plasmadas. En general después de 72 horas se obtuvieron monocapas de dicho tejido con muy poca contaminación con fibroblastos (1%). Los subcultivos se realizaron con una mezcla de 0.2

ml de pronasa (1 mg/ml) y 0.3 ml de tripsina (1 mg/ml) (Hornsby y col., 1971).

#### **1.4 Tumores melanoticos.**

Se utilizaron tumores melanoticos provenientes de metastasis a pulmon, las cuales se guardaron en N<sub>2</sub> liquido hasta su procesamiento.

#### **2. Curvas de crecimiento.**

Los estudios de proliferacion celular se realizaron cultivando las celulas a una densidad de  $5 \times 10^4$  por caja de 35 mm, con los medios y drogas correspondientes cuyo efecto se deseaba determinar. En los casos de cultivos celulares en presencia de albumina bovina las celulas se cultivaron en suero al 10% y se dejaron solamente durante 90 minutos con el objeto de permitir su adhesion a la placa. Despues de intervalos apropiados las celulas se lavaron con una solucion amortiguadora de fosfato salino (PBS) pH 7.4, se cosecharon con 0.7% de tripsina cristalina y 0.7 uM EDTA por 2 min a 37°C, se resuspendieron en 5 ml de medio y se procedio a contar las celulas viables por exclusion del colorante azul-trypan (0.3%) en una camara de Neubauer. Una vez contadas las celulas se utilizaron para las distintas determinaciones.



### **3. Obtencion de homogeneizados y sobrenadantes.**

#### **3.1. Homogeneizados a partir de cultivos celulares.**

Las células una vez cosechadas se centrifugaron a 500 g durante 2 min; el pellet resultante se lavó varias veces con una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) pH 7.4 frío y se resuspendió en 100 mM KCl, 40 mM de fosfato de potasio pH 7.4, y se sonico dos veces durante 10 segundos a una intensidad del 25%. (sonicador de punta, Branson, modelo 140 W). Estos homogeneizados se centrifugaron a 800 g durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas (Marklund y col., 1982).

#### **3.2. Homogeneizados a partir de hígado de rata.**

Una vez extraído el órgano se pesó y se homogeneizó en una solución amortiguadora de fosfatos 30 mM pH 7.4 en una relación 9:1 (vol/peso) a 4°C., luego se centrifugó a 800 g (2500 rpm) durante 10 min, el sobrenadante obtenido se utilizó para las diferentes determinaciones.

#### **3.3. Homogeneizados a partir de tumores melanóticos.**

Los tumores se pulverizaron en nitrógeno líquido, en un

mortero metalico, previa eliminacion de los coagulos visibles, enseguida se procedio a su homogeneizacion con un homogeneizador de tejido en una solucion amortiguadora de fosfatos 30 mM pH 7.4 (1/9 peso volumen), luego se tomaron alicuotas de 3 ml para sonicar con 3 pulsos de 20 seg a una intensidad de 25%. Enseguida se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 min. El sobrenadante obtenido se utilizo para la determinacion de las enzimas antioxidantes.

#### **4. Determinacion del consumo de oxigeno.**

El consumo de oxigeno de las suspensiones celulares o de los homogeneizados se determino en un electrodo tipo Clark (IQUIFIB-FQ/Madeic, Buenos Aires, Argentina) a 30°C. Diferentes alicuotas de las celulas suspendidas en una solucion amortiguadora de fosfato salino (PBS) o diferentes alicuotas de los homogeneizados de higado se adicionaron a 1.8 ml de una solucion de Krebs-Ringer-fosfato, 5 mM de glucosa, pH 7.4. La velocidad de consumo de oxigeno se determino durante los primeros minutos de respuesta lineal (2-5 min) y se calculo en base al contenido de oxigeno disuelto en la mezcla de reaccion (0.22mM) a 30°C (Estabrook, 1967)

#### **5. Determinacion de la quimioluminiscencia espontanea en cultivos celulares**

La determinación de la quimioluminiscencia emitida por monocapas celulares se utilizó como una medida de la concentración de especies excitadas (oxígeno singlete y carbonilos excitados) generadas durante las diferentes reacciones metabólicas de carácter oxidativo.

Para estas determinaciones se utilizó un contador de fotones (Johnson Research Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA). Este aparato consta de tubo fotomultiplicador EMI 9658 B, cuya fotosensibilidad está entre las longitudes de onda 300-900 nm, el fotomultiplicador se encuentra conectado con una fuente de alto voltaje, de rango 0-3 kV; y a un amplificador-discriminador cuya función es seleccionar la señal que envía el fotomultiplicador dentro de un umbral regulable. Esto se hace en base a la altura del pulso emitido, la señal que llega del amplificador es canalizada a un contador de frecuencias digital y a un registrador continuo. Con el objeto de obtener emisiones bajas y estables el fotomultiplicador se mantiene a  $-18^{\circ}\text{C}$  con un enfriador termoelectrónico.

Las células se cultivaron hasta llegar a confluencia en cajas de Petri plásticas de  $100\text{ mm}^2$  (p-100). En el momento de la medición se lavaron 2 veces con una solución de PBS frío y luego se cubrió la monocapa de células con 4 ml de PBS se dejó estabilizar durante 5 minutos y se colocaron en la cámara de medida la cual se encuentra termostaticada a  $30^{\circ}\text{C}$  a una mínima distancia de la guía

optica con el objeto de no perder emision. Como control se utilizaron cajas de petri sin celulas y con 4 ml de FBS. La emision de los controles fue de  $25 \pm 6$  cps/caja). Antes de cada experimento todos los materiales se mantuvieron en la obscuridad durante una hora.

Los valores obtenidos a partir de monocapas en cultivo fueron mas homogeneos que los obtenidos utilizando suspensiones de las mismas.

## **6. Determinacion de la actividad de las enzimas antioxidantes**

Los sobrenadantes descritos en el item 3.1 se utilizaron para realizar las siguientes determinaciones enzimaticas:

### **6.1. Actividad de superoxido dismutasa.**

El metodo que se utilizo es un metodo indirecto el cual consta de dos sistemas; uno que genera  $O_2$  y otro que reacciona en forma controlable con este radical. La actividad de superoxido dismutasa se determina por su habilidad para inhibir esta reaccion. Se utilizo como sistema generador de  $O_2$  la autooxidacion del bitartrato de adrenalina a pH alcalino. A este pH la autooxidacion de la adrenalina genera adrenocromo cuya formacion se detecta a 480 nm, en un proceso que es inhibible en un 95% por la superoxido dismutasa. Se utilizo un espectrofotometro

Metrolab 325 en el cual se media la aparición de adrenocromo a 480 nm a 30°C en una solución amortiguadora de glicina-NaOH 50 mM pH 10.2 y una solución de bitartrato de adrenalina 1 mM ( Misra y Fridovich, 1972; Boveris y col., 1983). Se utilizó una solución de KCN 3mM para diferenciar la enzima Mn-superoxido dismutasa ya que la Cu-Zn-superoxido dismutasa es sensible a este tratamiento (Beauchamp y Fridovich, 1973)

Una unidad de superoxido dismutasa corresponde a la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de la autooxidación de la adrenalina y corresponde a 0.15 ug/ml o 4.7 nM de superoxido dismutasa.

## **6.2. Actividad de glutatión peroxidasa.**

Se utilizó el método de Gunzler y col. (1974), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistía de 100 uM de NADPH, 1 mM de glutatión, 0.6 U/ml de glutatión reductasa, 0.5 mM de tert-butilo, en sol amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.0, con un volumen final de 3 ml, midiéndose a 37°C y 340 nm la velocidad de desaparición de NADPH. Además del hidropéroxido de tert-butilo el cual se utilizó para la determinación de la actividad de glutatión peroxidasa total, se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (70 uM) como oxidante para la determinación de la glutatión peroxidasa dependiente de selenio. La actividad de glutatión peroxidasa no dependiente de selenio se estimó como la diferencia de la actividad determinada con

hidroperoxido de ter-butilo y  $H_2O_2$  como oxidantes, en este ultimo caso con inhibicion de la catalasa por adicion de 3.5 mM de azida.

### **6.3. Actividad de Catalasa.**

Se utilizaron diferentes metodos para determinar la actividad de catalasa en los homogeneizados y sobrenadantes celulares.

#### **6.3.1. Metodo espectrofotometrico UV.**

Este metodo permite la determinacion de catalasa a traves de la medicion espectrofotometrica de la disminucion en la absorcion del  $H_2O_2$  a 240 nm, descrito por Beers y col. (1952). La descomposicion del  $H_2O_2$  sigue una cinetica de pseudoprimer orden donde  $k' = k[cat]$  y  $k = 4.6 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ . Se utilizo una solucion reguladora de fosfatos, pH 7.2 y 2 mM de  $H_2O_2$ . La actividad se expresa como la cantidad en moles o concentracion (M) de catalasa en la muestra de reaccion .

#### **6.3.2. Metodo del sulfato de titanio.**

El segundo metodo utilizado fue el espectrofotometrico de Baudhuin y col. (1964). Las muestras se trataron con 1% (v/v) Triton X-100 para liberar la enzima y se incubaron a  $0^\circ C$  durante 3 min en un volumen final de 5.2 ml de una solucion

reguladora (10mM) de imidazol-HCl, pH 7.2 , albumina bovina 0.1% y peroxido de hidrogeno (3 mM). La reaccion se detuvo por la adicion de 3 ml de sulfato de titanio en 2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remanente se determino en la mezcla de reaccion colorimetricamente como peroxi-sulfato de titanio de color amarillo. Con este metodo la descomposicion del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sigue una cinetica de primer orden. Una unidad de actividad en este ensayo se define como la cantidad de enzima capaz de descomponer el 90% del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicial en 50 ml (45 umol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un minuto, a 0°C. Dado que la temperatura de la reaccion es 0 °C, la constante de reaccion se calculo a traves de un grafico de Arrhenius, utilizandose una energia de activacion de 7 kcal/mol (Lehninger, 1978) el valor obtenido para  $k = 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Una unidad Baudhuin corresponde a  $2.08 \times 10^{-2} \text{ uM}$  catalasa.

### 6.3.3. Metodo Polarografico.

El tercer metodo utilizado fue el polarografico de Del Rio y col. (1957). Se utilizo un electrodo de Clark para la medida de las velocidades iniciales de liberacion de oxigeno por la enzima en un medio burbujeado previamente con nitrogeno con el objeto de desplazar el oxigeno. Este metodo resulta ser alrededor de 50 veces mas sensible que los metodos espectrofotometricos convencionales. Los sobrenadantes celulares se trataron con 1% de etanol para impedir la formacion del compuesto-II de la catalasa.

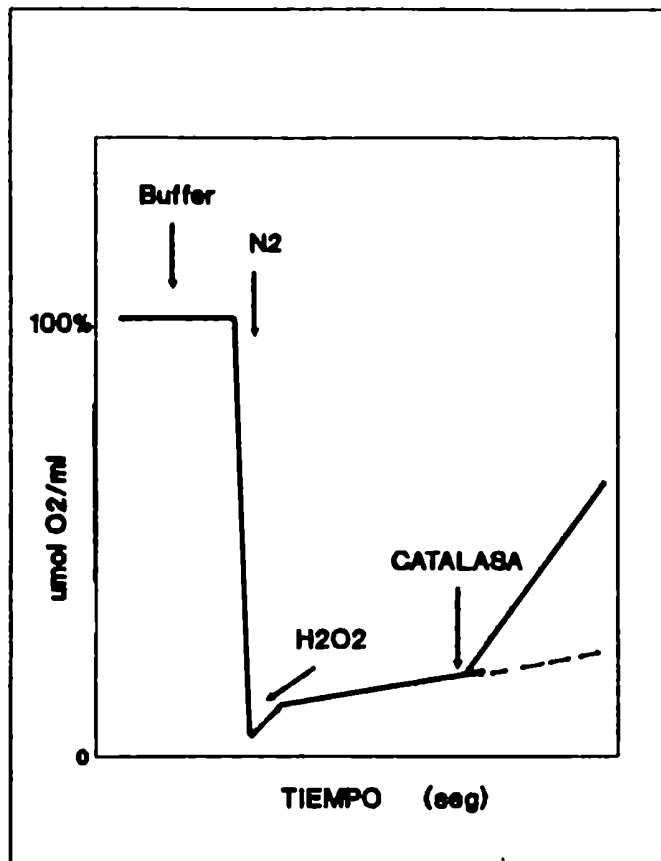


FIG 5. REGISTRO POLAROGRAFICO DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA. LA LECTURA INICIAL SE REALIZA SOBRE UNA SOLUCION AMORTIGUADORA SATURADA CON AIRE Y CORRESPONDE AL 100%.

#### 6.3.4. Conversion de las unidades obtenidas en los diferentes metodos utilizados para la determinacion de la actividad de catalasa.

Debido a que cada metodo posee una unidad diferente es necesario definir las condiciones del ensayo y expresar claramente los resultados con el fin de permitir comparaciones. Es aconsejable expresar la actividad enzimatica de la catalasa en unidades de concentracion molar o en numero de moles de catalasa por gramo de tejido. (ver Tabla de conversion de unidades para los diferentes metodos)



**Definicion de unidades:**

**1 unidad Sigma:** corresponde a la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 0.9 mM de  $H_2O_2$  en un minuto. Cuando la concentracion de  $H_2O_2$  pasa de 10.2 a 9.3 mM a 25°C (.).

**1 unidad Beaudhuin ( $SO_4Ti$ ):** corresponde a la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 45  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  en 1 minuto, a 0°C. ( $H_2O_2=3mM$ )

**1 unidad del Rio:** corresponde a la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 0.13 mM de  $H_2O_2$  en un minuto a 30°C. ( $H_2O_2=7.5$  mM).

**Tabla 4****CONVERSION DE UNIDADES DE CATALASA**

| UNIDADES               |                           |                    |                       |                      |
|------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
|                        | Beaudhuin<br>( $SO_4Ti$ ) | Sigma              | del Rio<br>(polargr.) | $\mu$ M              |
| Beaudhuin ( $SO_4Ti$ ) | 1                         | 45                 | 385**                 | $1.8 \times 10^{-2}$ |
| Sigma                  | 0.022                     | 1                  | 7.7                   | $3.6 \times 10^{-4}$ |
| del Rio                | $2.9 \times 10^{-3}$ *    | 0.13               | 1                     | $6.3 \times 10^{-4}$ |
| $\mu$ M                | 48.08                     | $0.25 \times 10^4$ | $2.4 \times 10^{-3}$  | 1                    |

\*  $3.5 \times 10^{-3}$  PROMEDIO DE DATOS OBTENIDO PARA HIGADO Y CELULAS.

\*\* 440 PROMEDIO DE DATOS OBTENIDO PARA HIGADO DE RATA Y CELULAS EN CULTIVO.

#### 6.4. Corrección de los valores obtenidos para las enzimas antioxidantes debido a contaminación con enzimas eritrocitarias.

Dado el alto contenido de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa presente en los eritrocitos, fue necesario corregir los valores obtenidos en los sobrenadantes tumorales por el aporte de los eritrocitos presentes en el homogeneizado tumoral. Se utilizó el método de Cross y col. (1979), una alícuota de 250  $\mu$ l de homogeneizado tumoral se llevó a 1 ml con una solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M y 1% de Triton X-100, luego se agregaron diferentes alícuotas de sangre (correspondiente al mismo paciente, cuyo tumor se estudiaba), y se centrifugaron durante 10 min a 4°C a 11000 g. Se tomó el sobrenadante y se leyó la absorción a 415 nm (hemoglobina oxidada). Luego se agregó a este sobrenadante 100  $\mu$ l de ditionita de sodio 0.1 M en NaOH 0.1 M, mezclando la cuveta por inversión, y se leyó nuevamente la absorción a 415 nm. Cálculos:  $[\text{Absorción Hb oxidada} - (1.1 \times \text{Absorción de Hb reducida})] \times 5 = \text{Absorción "sensible a ditionito"}$ . El factor 1.1 corrige el cambio de volumen después de la adición del ditionito de sodio (100  $\mu$ l) y el factor 5 corrige la dilución de la alícuota de los 250  $\mu$ l originales. Para calcular la contaminación por sangre en el homogeneizado se construyó

una curva de calibración, colocando en el eje de las abscisas los  $\mu$ l de sangre total agregada a la muestra de homogeneizado y en el eje de las ordenadas la absorción sensible a ditionita. El punto de corte de las abscisas corresponde a los  $\mu$ l de sangre en el homogeneizado. De estos datos y de los valores correspondientes de actividades de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa de sangre correspondiente al paciente cuyo tumor se investigó, se calculó la contaminación debida a las enzimas eritrocitarias.

#### **7. Determinación de la concentración en el estado estacionario de $H_2O_2$ en cultivos celulares.**

Las células se cultivaron a densidad de  $100 \times 10^3$  células/p-100, una vez que los cultivos celulares llegaron a confluencia se les extrajo el medio, se lavaron 2 veces y luego se cubrieron con 3 ml de PBS. Luego se colocaron nuevamente en la estufa a  $37^\circ C$  y se tomaron alícuotas de 0.5 ml a los 0, 60, 120 y 180 minutos. Las muestras se colocaron a  $-70^\circ C$  en recipientes de vidrio especialmente lavados para este ensayo. La concentración de peróxido de hidrógeno en el estado estacionario se calculó midiendo la quimioluminiscencia producida a través del método del luminol (Seitz, 1978; Puntarulo y col., 1988). El luminol (5-amino, 2-3, dihidro, 1-4-ftalazina-diona) requiere de la presencia de un oxidante en presencia de un catalizador

metalico para producir un estado excitado, que, al volver a su estado fundamental, emite luz. Esta reaccion se llevo a cabo en un vial de centelleo con una solucion amortiguadora 0.25 M  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1  $\mu\text{M}$  luminol, 3  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{+2}$ , pH 10.5. La emision se midio a temperatura ambiente en un contador de centelleo liquido Pakard Tri-Carb modelo 3320. Como estandar se prepararon soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 1-10  $\mu\text{M}$  tituladas espectrofotometricamente a 240 nm ( $E = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se realizaron paralelamente controles con la presencia de 10  $\mu\text{M}$  de catalasa con el objeto de determinar la quimioluminiscencia sensible a catalasa; la quimioluminiscencia no sensible a catalasa fue generalmente menor del 20% de las muestras.

#### **8. Determinacion del efecto del $\text{H}_2\text{O}_2$ generado extracelularmente sobre cultivos celulares**

La citotoxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre los cultivos de celulas de melanoma se determino a traves de la exposicion de las celulas a un sistema enzimatico generador de peroxido de hidrogeno como es la mezcla glucosa - glucosa oxidasa (Mimmaugh y col., 1989). Las celulas se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  celulas/placa de 35 mm con medio completo. Despues de 24-30 horas se sembradas se suplementaron con una solucion amortiguadora de fosfatos salina, pH 7.4, 10 mM de glucosa y diferentes concentraciones de glucosa oxidasa. Una unidad de glucosa oxidasa oxida 1  $\mu\text{mol}$  de D-glucosa a 1  $\mu\text{mol}$

de ácido gluconico más 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno a  $35^{\circ}\text{C}$  y pH 7.5.

Las células se incubaron durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , luego de 2 lavados se suplementaron con medio fresco y se cultivaron durante 72 horas más en condiciones normales. Luego las células se tripsinizaron y se determinó su viabilidad contando las después de agregarles azul trypan.

#### **9. Determinación de la producción de sustancias que reaccionan con ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

El método del ácido tiobarbitúrico se utilizó como una medida de peroxidación lipídica a través de la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) condensadas como malondialdehído en su mayor parte (Slater y Sawyer, 1971). La determinación en las células en cultivo se hizo después de cosecharlas y lavarlas con una solución PBS, pH 7.4, previa adición de diferentes agentes cuando fue necesario. Las determinaciones se realizaron sobre muestras celulares de 3 mg de proteína. Cuando se utilizaron homogeneizados de hígado de rata la determinación de malondialdehído (TBARS) se realizó después de incubar las muestras durante los tiempos y temperaturas en estudio, y después de la adición de iniciadores de la lipoperoxidación en los casos en que fue necesario, la concentración de proteína utilizada en estos ensayos fue de 1.5-2 mg de proteína/ml.

Las muestras se trataron con ácido tricloroacético (TCA) al 20% y luego se centrifugaron durante 15 min a 4000 rpm; a 2 ml de el sobrenadante (transparente) se le adiciono 1 ml de ácido tiobarbiturico (TBA) al 0.7% y 20  $\mu$ l de butiril-hidroxi-tolueno al 4% en etanol (Buege y Aust, 1978; Asakawa y Matsushita, 1982). Luego se calentaron en un baño a 95°C durante 10 min. La determinación espectrofotométrica a 530 nm permite calcular los TBARS como equivalentes a malondialdehído mediante una recta de calibración obtenida con 11,33-tetra-etoxipropano, o con el  $E=156\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Esterbauer y col., 1982).

#### **10. Determinación de melanina.**

Se llevaron a cabo ensayos cualitativos que consistieron en una comparación de los espectros de absorción en el rango 300-800 nm de la melanina extraída de diferentes fuentes y de la melanina sintética (Sigma) obtenida por oxidación de la L-tirosina por persulfato.

##### **10.1. Detección de melanina en cultivos celulares.**

Se utilizó un ensayo citoquímico para la detección de melanina en los cultivos celulares según el método de Lerner (1955). Los cultivos celulares se lavaron y se incubaron con 0.1% de dihidroxifenilalanina (DOPA) en 0.1 M de solución

amortiguadora de fosfato pH 7.4, durante 1 h a 37°C. Luego las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfato salino pH 7.4 (PBS), y se fijaron con 96% de metanol a 4°C por 10 min, se lavaron y se contrastaron con hematoxilina de Mayer.

### **10.2. Determinación de melanina en células aisladas.**

La cuantificación de melanina en las células se hizo con el método de Meykens (1980). Se solubilizaron  $1 \times 10^4$  células con 1 ml de NaOH 1 N y 10.% de sulfoxido de dimetilo (DMSO) durante 30 min, luego se midió la absorción de luz a 470 nm y se expresó el contenido de melanina como  $\mu\text{g}$  de melanina por  $10^4$  células, a partir de una recta de calibración con melanina sintética.

### **10.3. Aislamiento y cuantificación de melanina proveniente de tumores.**

La melanina tumoral se obtuvo a partir de tumores melanóticos previa disgregación de las células con colagenasa. Luego de varios lavados con solución amortiguadora de fosfato salino el precipitado celular se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM y se sonicaron con dos pulsos de 20 segundos a una intensidad del 20%; en un sonicador marca Branson, modelo 140 W, enseguida se centrifugaron las células a 2500 rpm durante 20

min. El pellet oscuro de melanina se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM y se mantuvo siempre a 4°C. El pellet aislado consistió totalmente de un complejo melano-proteína. Luego se cuantificó la melanina mediante su ensayo espectrofotométrico. La melanina se desproteinizó por tratamiento con HCl al 37% durante 48 horas al cabo de las cuales se calentó durante 60 minutos a 100°C. Luego se lavó con agua destilada varias veces hasta la neutralidad.

#### **11. Determinación del contenido de $\text{Cu}^{+2}$ en las preparaciones de melanina sintética y tumoral.**

El contenido de  $\text{Cu}^{+2}$  presente en las preparaciones de melanina sintética y tumoral se determinó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Varian modelo AA475; a través del método de atomización en llama, utilizando una lámpara de Cu de cátodo hueco. Las mediciones se realizaron directamente sobre las preparaciones de melanina sintética y de melanina tumoral los valores obtenidos se extrapolaron a partir de una recta de calibración de sulfato de cobre, en un rango de 0.10 a 0.50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **12. Determinación de la lipoperoxidación en homogeneizados de hígado de rata.**

##### **12.1. Lipoperoxidación espontánea.**



Se midió la lipoperoxidación espontánea de un homogeneizado de hígado de rata, el cual se incubó en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, 120 mM de KCl, pH 7.4, a diferentes temperaturas y durante diferentes tiempos al cabo de los cuales se midió la producción de TBARS.

### **12.2. Lipoperoxidación iniciada por hidroperoxido de tert-butilo.**

Se utilizó el hidroperoxido de tert-butilo en una concentración 3 mM para iniciar la lipoperoxidación en homogeneizados de hígado de rata. La reacción se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfatos 30 mM y 120 mM de KCl pH 7.4, incubando a 37°C durante 30 min, al cabo de los cuales se determinó la producción de TBARS. (Gonzalez Flecha, 1991), así como el consumo de oxígeno.

### **12.3. Lipoperoxidación iniciada por 2,2-Azobis(2-amidinopropano) dihidro-cloruro (AAPH).**

El compuesto 2,2 azo-bis-2amidinopropano hidrocloreuro (AAPH) se ha propuesto como una fuente de radicales libres en sistemas no catalizados debido a que puede generar radicales libres a velocidades conocidas y constantes (Yamamoto y col., 1985). El AAPH se utilizó en una concentración de 25 mM, la reacción se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfato 30 mM y 120 mM KCl pH 7.2, incubando a 38°C durante

120 min.

**13. Determinacion de la inhibicion de la actividad de la glucosa oxidasa por 2,2-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro**

Se utilizo el sistema de inactivacion de la enzima glucosa oxidasa por los radicales alquil peroxidos y alcohoxilos generados a partir de la ruptura termica del AAPH despues de combinarse con oxigeno, con el objeto de medir la capacidad protectora de la melanina en dicho sistema. Una solucion de glucosa oxidasa 1.25 mM (0.2 mg/ml) se coloco en presencia de una solucion 15 mM de AAPH en una solucion amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.2, a 38°C. Se tomaron alicuotas de 0.5 ml a intervalos de 10 min durante una hora y media. Cada una de estas alicuotas se coloco en 1.5 ml de solucion amortiguadora de fosfatos y 5 mM de glucosa con el objeto de medir la actividad de la enzima a traves de la velocidad inicial de consumo de oxigeno en un electrodo tipo Clark a pH 7.2. El efecto de diferentes concentraciones de melanina se determino con respecto a la actividad de la enzima glucosa oxidasa. Como se expreso antes es posible determinar el numero de radicales generados por mol de enzima inactivada (Yamamoto y col., 1985) segun los datos siguientes:

$$K_d = 4 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$$

$$\text{N}^\circ \text{ de radicales por mol de AAPH} = 2$$

[AAPH] = 15 mM

Nº de radicales/vol = 2 Kd [AAPH] t

Nº de radicales /vol (60 min) =  $2.4 \times 10^{-7}$  [15mM] 3600

Nº de radicales/vol (60 min) = 0.0432 mM

Nº de Enzima / vol = (% inactivacion) [enzima inicial]  $100^{-1}$

Nº de enzima/vol (60 min) = 50 [1.25  $10^{-3}$  mM]  $100^{-1}$

Nº de enzima/vol (60 min) =  $6.25 \times 10^{-4}$  mM

Nº de radicales/ Enzima inactivada =  $0.043 \text{ mM} / 6.25 \times 10^{-4} \text{ mM}$

" " " " " = 70/mol enzima inactivada

#### 14. Determinacion de proteina.

Se utilizo el metodo de Lowry y col (1951) con las muestras tanto de sobrenadantes celulares como de homogeneizados de higado de rata. El metodo se basa en la reaccion de el reactivo de Folin-Cicalteau con las proteinas dando un color azul previa reaccion de estas con  $\text{Cu}^{+2}$  en medio alcalino y reduccion del tungstato por la proteina tratada con Cu. La absorcion se determino a 630 nm y la concentracion de proteina se calculo por intrapolacion en una recta de calibracion hecha con albumina bovina (1mg/ml).

#### 15. Reactivos

Insulina, albumina bovina, bitartrato de adrenalina,

NADPH, glutation, glutation reductasa de levadura, acido tiobarbiturico, peroxido de hidrogeno, hidroperoxido de tert-butilo, factor de crecimiento epidermico (EGF), galactosa, glutamina, piruvato de sodio, selenito de sodio, acido ascorbico, melanina y transferrina, fueron adquiridos en Sigma Chemical Company, (St Louis Mo, USA); el suero fetal bovino se obtuvo en Laboratorios Gibco, (New York, NY, USA) y la Adriamicina se adquirio en Montedison Farmaceutica (Buenos Aires, Argentina). El 2,2-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro fue provisto por el Dr Eduardo Lissi de la Universidad de Santiago de Chile. Todos los demas reactivos utilizados fueron de grado analitico.

#### **16. Estadistico.**

Los valores en tablas y figuras representan valores medios  $\pm$  error estandar de la media ( $X \pm SEM$ ). Las diferencias intermedias se calculan con el test de T.

# RESULTADOS

# CAPITULO I

ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE HIDROPEROXIDOS EN CELULAS DE CARCINOMA DE MAMA (MCF-7).

1. Cultivo de las células en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de selenio.

1.1. Efecto de la ausencia de suero sobre el crecimiento celular.

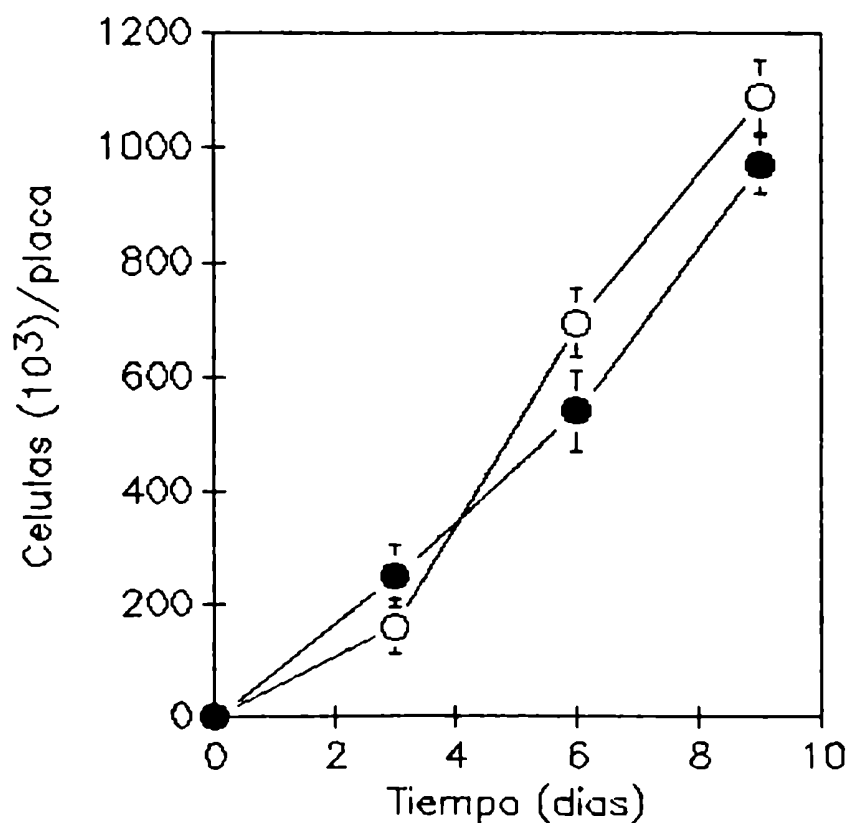


FIG. 6. CRECIMIENTO DE LAS CELULAS MCF-7 EN PRESENCIA DE SUERO FETAL BOVINO Y EN PRESENCIA DE ALBUMINA BOVINA, LAS CELULAS SE PLAQUEARON A UNA DENSIDAD DE  $5 \times 10^4$  CELULAS/CAJA DE 35 MM. (O), CURVA DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE SUERO FETAL BOVINO; (●), CURVA DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE ALBUMINA BOVINA (1MG/ML).

Las células cultivadas en presencia de suero fetal bovino (10 %) o de albumina bovina (1 mg/ml) e insulina (10 ug/ml) presentaron igual capacidad proliferativa (Fig. 6), de acuerdo a observaciones previas de Resnicoff y Medrano (1987), quienes habían encontrado que estas células pueden crecer en presencia de albumina (1 mg/ml) e insulina (10 ug/ml) como único factor de crecimiento y que los demás factores como EGF, transferrina y trombina se requieren o no según la densidad a la cual se desean cultivar las células.

### **1.2. Efecto de la ausencia de suero sobre los niveles de las enzimas antioxidantes.**

La deficiencia de selenio no afectó las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, pero sí afectó las actividades de la enzima glutatión peroxidasa (Tabla 5).

### **1.3. Efecto de la ausencia de suero sobre la disminución de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.**

Las células se cultivaron en presencia de albumina y en ausencia de suero; utilizándose este solamente durante la adhesión de las células a la placa.



Tabla 5.

**EFFECTO DE LA AUSENCIA DE SUERO SOBRE LOS NIVELES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.**

LAS CELULAS SE CULTIVARON EN MEDIO DULBECCO/F12 (1:1) EN PRESENCIA DE 10% DE SUERO FETAL BOVINO Y 10 UG/ML DE INSULINA O EN 1 MG/ML DE ALBUMINA BOVINA MAS 10 UG/ML DE INSULINA HASTA LLEGAR A CONFLUENCIA. LUEGO SE COSECHARON Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SE DETERMINARON

| Actividad enzimatica                        | Medio de cultivo |                   |
|---|------------------|-------------------|
|   | Suero (10%)      | albumina(1 mg/ml) |
| -----                                       |                  |                   |
| Superoxido dismutasa<br>(U/mg de proteina)  |                  |                   |
| Cu-Zn-superoxido dismutasa                  | 4.4 ± 0.30       | 4.0 ± 0.20        |
| Mn-superoxido dismutasa                     | 1.0 ± 0.02       | 0.9 ± 0.05        |
| Glutation peroxidasa<br>(mU/mg de proteina) |                  |                   |
| dependiente de Se                           | 5.8 ± 0.4        | 2.0 ± 0.30a       |
| independiente de Se                         | 1.9 ± 0.2        | 1.8 ± 0.30        |
| Catalasa<br>(U/mg de proteina)              | 0.037 ± 0.005    | 0.032 ± 0.003     |

-----  
 A SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE LOS CULTIVOS CON SFB PARA UN P,0.001 Y REPRESENTA LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA OBTENIDA DESPUES DE CULTIVAR LAS CELULAS DURANTE 20 DIAS EN MEDIO DEFINIDO.

Las células mostraron una disminución en la actividad de la glutacion peroxidasa proporcional al tiempo en ausencia de suero estabilizandose alrededor de los 20 a 30 dias de crecimiento sin suero en 2.0±0.3 umol NADPH/min/mg proteina, (Figura 7).

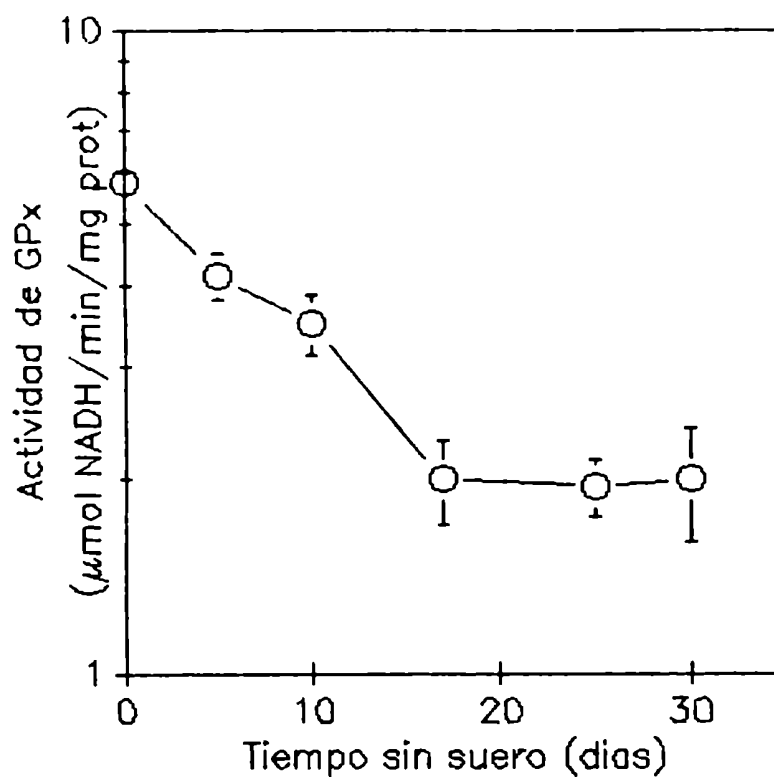


FIG. 7. EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO EN AUSENCIA DE SUERO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA. LAS CELULAS SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE ALBUMINA BOVINA 1 MG/ML Y 10 UG/ML DE INSULINA DURANTE PERIODOS DE 10, 17, 25 Y 30 DIAS, AL CABO DE LOS CUALES SE COSECHARON Y SE PROCESARON PARA LA DETERMINACION DE LA ENZIMA GPX .

#### 1.4. Efecto de la presencia de selenio en el medio de cultivo.

Las células cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de selenito de sodio presentaron una inhibición del crecimiento del 80%, las diferencias entre las distintas concentraciones fueron muy leves (Fig 8).

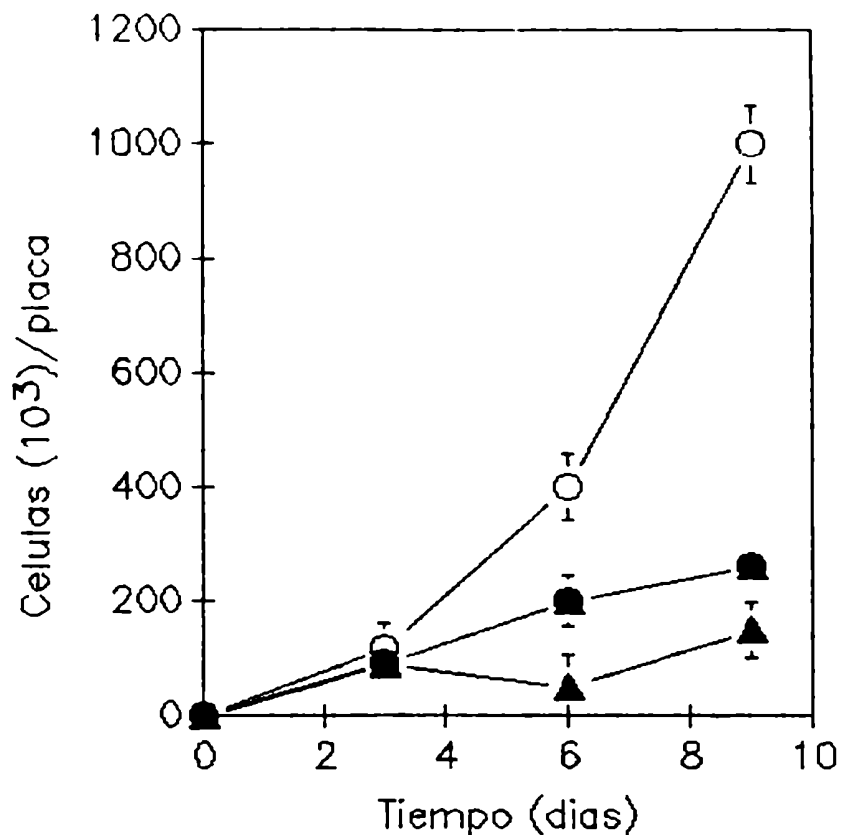


FIG. 8. EFECTO DE LA PRESENCIA DE SELENIO EN EL MEDIO DE CULTIVO . LAS CELULAS SE CULTIVARON A UNA DENSIDAD DE  $5 \times 10^4$  CELULAS POR PLACA DE 35 MM DESPUES DE SU ADHESION A LA PLACA SE LES AGREGO EN EL MEDIO DE CULTIVO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SELENITO DE SODIO; AL CABO DE 3, 7, 10 DIAS SE COSECHARON Y SE CONTARON EN UNA CAMARA DE NEUBAUER. (○), CONTROL; (■), 10 nM; (△), 20 nM; (▲), 50 nM.

## 2. Estres oxidativo inducido sobre cultivos celulares de carcinoma mamario por el antibiotico adriamicina.

### 2.1. Caracteristicas morfologicas del cultivo celular.

Se encontraron diferencias importantes despues de cultivar las celulas en presencia de  $10^{-7}$  M adriamicina durante 9 dias. Los cultivos mostraron una reversion parcial hacia un epitelio normal, con limites intercelulares bien delimitados, mayor tamaño celular, con monocapas bien definidas; mientras que los cultivos en ausencia de

adriamicina mostraron una gran proliferacion con multicapas de celulas de menor tamaño no siendo posible distinguir los limites celulares. Es importante recordar que esta linea celular no ha sido clonada y presenta una gran heterogeneidad con subpoblaciones con diferentes grados de diferenciacion (Resnicoff y col., 1987) (Fig 9 a). Sobre el tamaño celular la adriamicina mostro un claro efecto hiperplastico (Fig. 9 b), siendo el diametro celular de las celulas tratadas 40% mas grande que el de las no tratadas; esto corresponde a un aumento de 2.7 veces el volumen celular. (Fig. 10 a,b). Todos los cultivos celulares mostraron una distribucion bimodal del tamaño de los diametros segun se observa en la Tabla 6.

Tabla 6

EFFECTO DE LA ADRIAMICINA SOBRE EL TAMANO DE LAS CELULAS MCF-7

LAS CELULAS MCF-7 SE CULTIVARON Y SE COLOCARON EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACION DE  $10^{-7}$  M DE ADR DURANTE 9 DIAS , LUEGO DE TRIPSINIZARLAS SE COSECHARON Y SE RESUSPENDIERON EN MEDIO CON 10% DE SUERO FETAL BOVINO Y UNA ALICUOTA SE COLOCO EN UNA CAMARA DE NEUBAUER. LUEGO SE OBTUVIERON 10 SERIES DE MICROFOTOGRAFIAS CON EL OBJETO DE REALIZAR MEDIDAS SERIADAS DE LOS DIAMETROS CELULARES .

| CELULAS             | DIAMETRO (U) |            |            |
|---------------------|--------------|------------|------------|
|                     | PROMEDIO     | MODO 1*    | MODO 2*    |
| MCF-7               | 15.3+2.9     | 13 (61%)   | 19 (39%)   |
| MCF-7 + ADRIAMICINA | 21.5+3.9     | 19.7 (73%) | 26.3 (27%) |

\*DETALLE EN EL TEXTO  
EL NUMERO EN PARENTESIS INDICA EL PORCENTAJE DE CADA MODO.

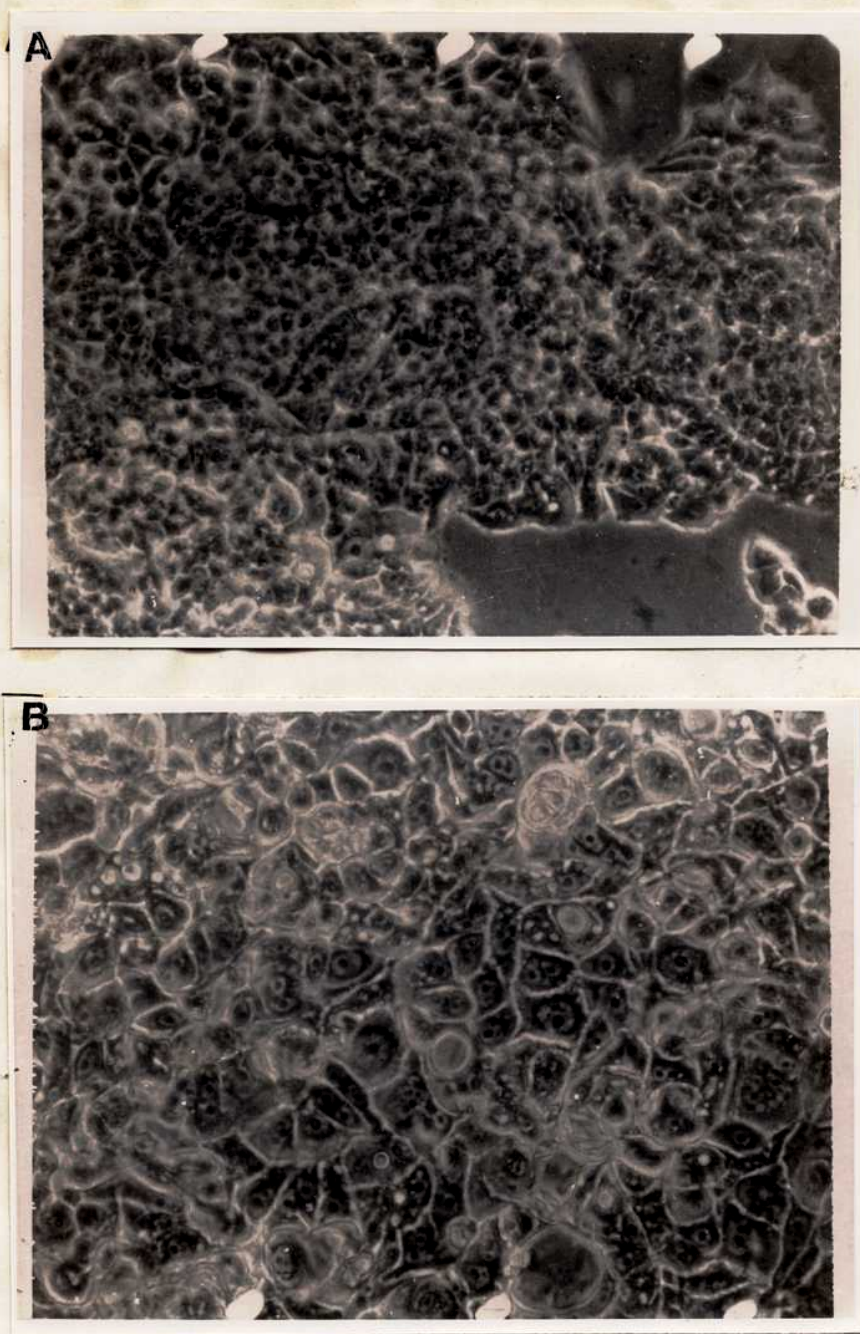


FIG. 9. MICROFOTOGRAFÍAS DE CONTRASTE DE FASE DE CULTIVOS DE CELULAS MCF-7, CULTIVADAS EN DULBECCO/F12 (1:1), 1MG/ML BSA. (AUMENTO: 100X). A: MCF-7; B: MCF-7 CULTIVADAS EN PRESENCIA DE  $10^{-7}$  M ADR DURANTE 9 DIAS.

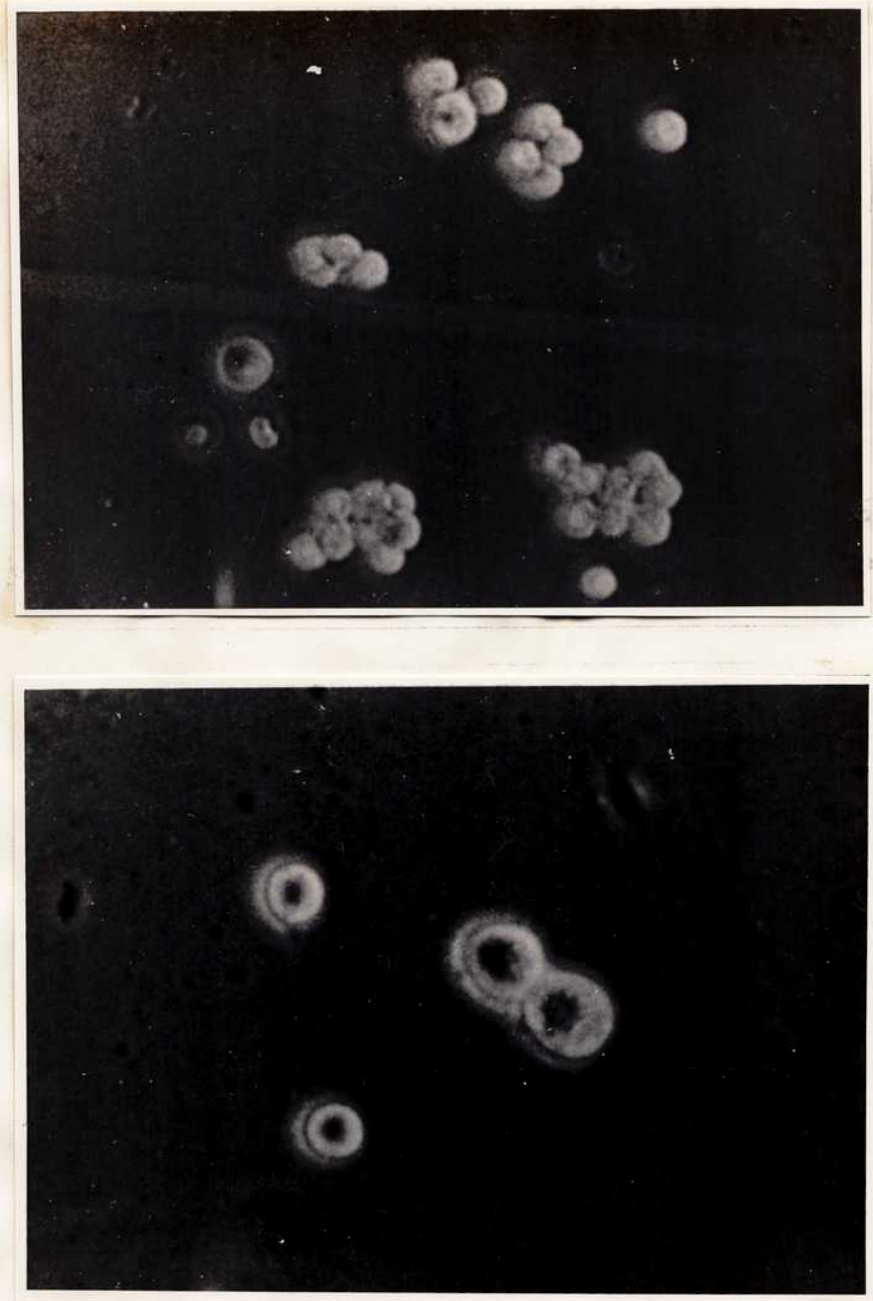


FIG 10. MICROFOTOGRAFIAS DE CONTRASTE DE FASE DE CELULAS MCF-7 CULTIVADAS EN DULBECCO/F12 (1:1), 1 MG/ML BSA; COSECHADAS Y RESUSPENDIDAS EN PBS. (AUMENTO:100X). A: MCF-7; B: MCF-7 EN PRESENCIA DE  $10^{-7}$  M ADR DURANTE 9 DIAS.

**2.2. Efecto de la adriamicina sobre la proliferacion celular.**

El antibiotico adriamicina mostro una clara inhibicion de la duplicacion celular proporcional a su concentracion en el medio de cultivo (Fig 11).

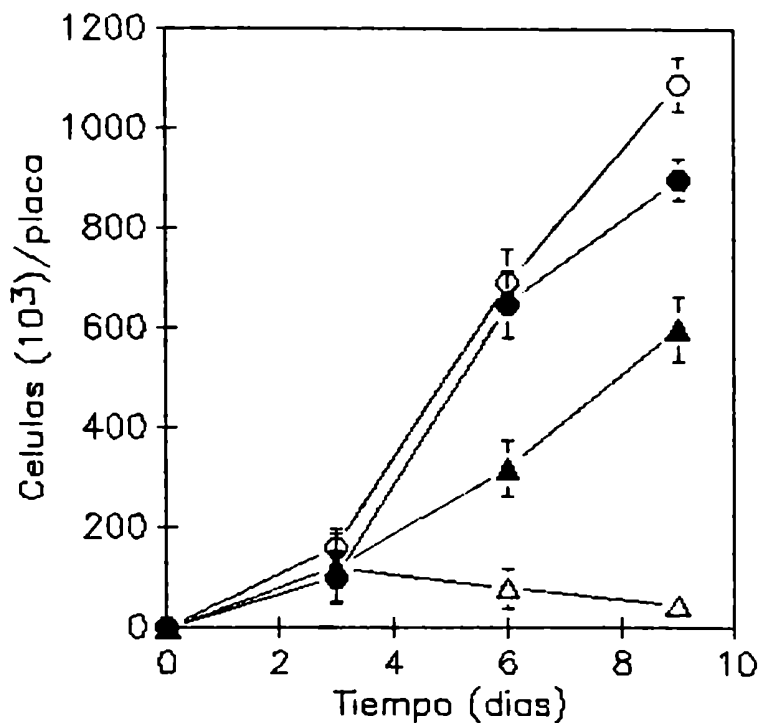


FIG. 11. EFECTO DE LA ADRIAMICINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS CELULAS MCF-7. LAS CELULAS SE PLAQUEARON 5x10<sup>4</sup> CELULAS / CAJA DE 35 MM EN DULBECCO/F12 (1:1). LUEGO DE 3, 6, 9 DIAS DE EXPOSICION A LA ADRIAMICINA SE COSECHARON Y SE CONTARON. (○), CONTROL; (●), 10<sup>-6</sup> M; (▲), 0.3x10<sup>-7</sup> M; (△), 10<sup>-7</sup> M.

Siendo la IC<sub>50</sub> de 30 nM la cual esta cerca a los valores de 7 nM obtenidos por Mimmaugh y col., (1989).

### 2.3. Efecto de la adriamicina sobre las actividades de las enzimas antioxidantes.

Las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa no presentaron variación debido a la presencia de una concentración de  $10^{-7}$  M adriamicina en el medio de cultivo durante nueve días. (Tabla 7).

**Tabla 7**

**ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CELULAS MCF-7 TRATADAS CON ADRIAMICINA.**

LAS CELULAS SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE  $10^{-7}$  M DE ADRIAMICINA DURANTE 9 DIAS, LUEGO SE COSECHARON SE RESUSPENDIERON Y SE DETERMINARON LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS COMO SE INDICA EN METODOS Y MATERIALES.

| PARAMETRO   | CELULAS     |                          |
|---|-------------|--------------------------|
|   | MCF-7       | MCF-7 + ADR              |
| SUPEROXIDO DISMUTASA <sup>a</sup><br>(U/MG PROTEINA)  | 5.6±0.1     | 4.7±0.8 <sup>c</sup>     |
| GLUTATION PEROXIDASA <sup>b</sup><br>(mU/MG PROTEINA) | 3.6±0.4     | 3.1±1.0 <sup>c</sup>     |
| CATALASA<br>(U/MG PROTEINA)                           | 0.034±0.003 | 0.047±0.012 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> ACTIVIDAD TOTAL DE SUPEROXIDO DISMUTASA

<sup>b</sup> LA ACTIVIDAD TOTAL DE LA ENZIMA GLUTATION PEROXIDASA SE DETERMINO UTILIZANDO HIDROPEROXIDO DE TER-BUTILO COMO SUBSTRATO.

<sup>c</sup> NO SE OBSERVO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL CONTROL.

**2.4. Efecto de la adriamicina sobre el consumo de oxígeno en presencia de cianuro.**

La velocidad de consumo de oxígeno de estas células se



determino a 30°C con un electrodo tipo Clark. Las células tratadas con adriamicina  $10^{-7}$  M durante nueve días mostraron un mayor consumo de oxígeno que las no tratadas. La respiración insensible a cianuro fue también más alta en las células crecidas en presencia de adriamicina que en las células no tratadas, siendo los valores obtenidos 35% y 12%, respectivamente (Fig 12).

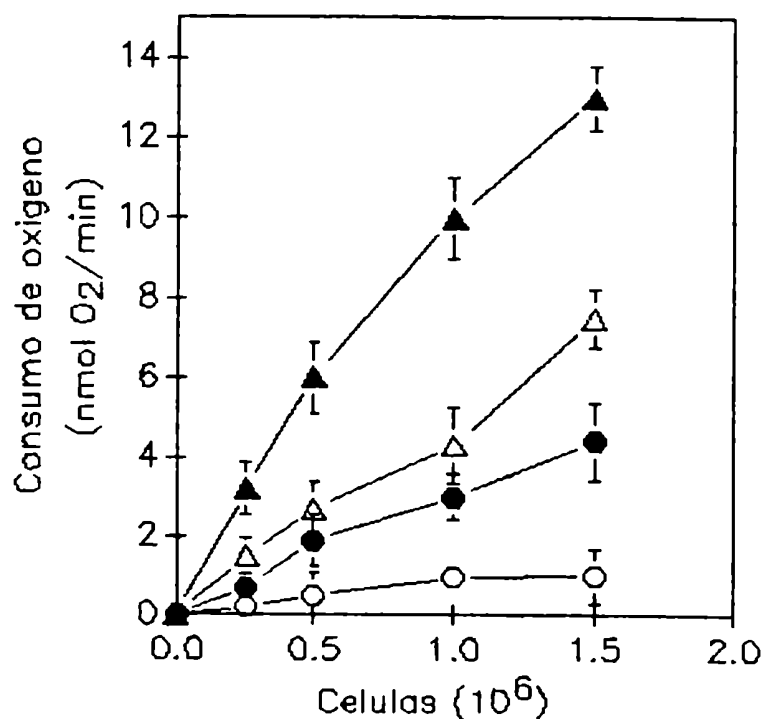


FIG. 12. CONSUMO DE OXIGENO DE LAS CELULAS MCF-7 EN PRESENCIA DE ADRIAMICINA Y CIANURO. LAS CELULAS SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACION DE  $10^{-7}$  M ADR DURANTE 9 DIAS LUEGO SE COSECHARON Y SE RESUSPENDIERON EN PBS, EL CONSUMO DE OXIGENO SE MIDIO A 30°C DURANTE 5 MINUTOS EN UN VOLUMEN DE 2 ML DE KRP 5 mM GLUCOSA PH 7.4 PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES CELULARES. ( $\Delta$ ), MCF-7; ( $\blacktriangle$ ), MCF-7 MAS ADR; (O), MCF-7 MAS 150  $\mu$ M CN; ( $\bullet$ ), MCF-7, ADR MAS 150  $\mu$ M CN.

## 2.5. Efecto de la adriamicina sobre la concentración intracelular de $H_2O_2$ en estado estacionario.

Las células de carcinoma de mama presentaron una exodifusión de  $H_2O_2$  hacia el medio, hasta alcanzar niveles constantes de peróxido de hidrógeno (Fig. 13). Estos niveles constantes de  $H_2O_2$  en estado estacionario se consideran iguales a los niveles intracelulares de  $H_2O_2$  (Puntarulo y col., 1988). Las células tratadas con adriamicina presentaron un aumento del 71% en la concentración de  $H_2O_2$  citosólico en estado estacionario comparado con las células controles (Tabla 8).

Tabla 8

CONCENTRACION DE  $H_2O_2$ , QUIMIOLUMINISCENCIA ESPONTANEA, PRODUCCION DE MALONDIALDEHIDO Y CONSUMO DE OXIGENO INSENSIBLE A CIANURO EN CELULAS MCF-7 TRATADAS CON ADRIAMICINA.

LAS CELULAS MCF-7 SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE  $10^{-7}$  M DE ADRIAMICINA DURANTE 9 DIAS.

| CELULAS   | $H_2O_2$<br>( $\mu$ M)        | MALONDIALDEHIDO<br>(PMOL/ MG PROTEINA) | QUIMIOLUMINISCENCIA<br>(CPS/MG PROTEINA) |
|-----------|-------------------------------|--|--|
| MCF-7     | 1.38 $\pm$ 0.21               | 56 $\pm$ 9                             | 81 $\pm$ 9                               |
| MCF-7+ADR | 2.36 $\pm$ 0.027 <sup>^</sup> | 107 $\pm$ 10 <sup>^</sup>              | 120 $\pm$ 11 <sup>^</sup>                |

<sup>^</sup> DIFERENCIA SIGNIFICATIVA PARA UN  $P < 0.01$  CON RESPECTO AL CONTROL.

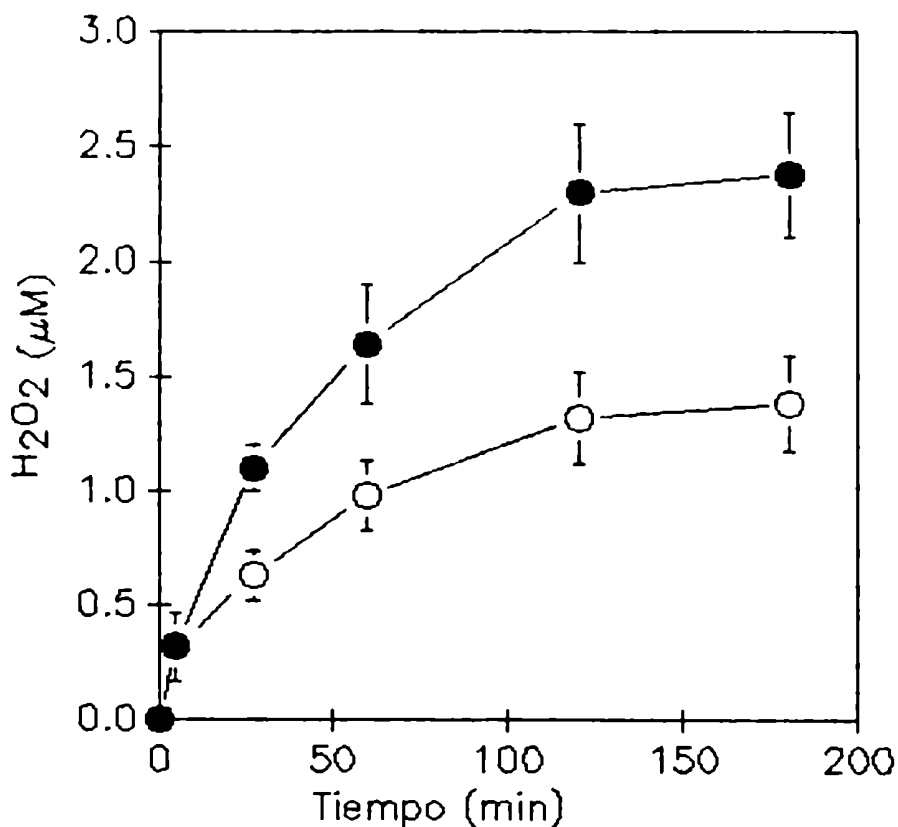


FIG. 13. CONCENTRACION DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN EL ESTADO ESTACIONARIO EN CELULAS EXPUESTAS A ADRIAMICINA. LAS CELULAS SE CULTIVARON EN PRESENCIA DE ADR 10<sup>-7</sup> M DURANTE 9 DIAS, LUEGO SE LAVARON EXTENSIVAMENTE Y SE CUBRIERON CON 3 ML DE SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO-SALINO. AL CABO DE 30, 60, 90, Y 180 SE COLECTARON MUESTRAS DE 0.5 ML Y SE DETERMINO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SEGUN SE DESCRIBE EN METODOS Y MATERIALES. (●) CELULAS TRATADAS CON ADR. (○) CELULAS CONTROL.

## 2.6. Efecto de la adriamicina sobre la quimioluminiscencia espontanea.

A las celulas crecidas en monocapas se les midio la quimioluminiscencia espontanea; las celulas tratadas con adriamicina 10<sup>-7</sup> M durante nueve dias presentaron un 33% mas de quimioluminiscencia que las no tratadas. (Tabla 8)

## 2.7. Efecto de la adriamicina sobre la produccion de sustancias reactivas con acido tiobarbiturico (TBARS).

La producción de sustancias reactivas con tiobarbiturico fue paralela al aumento de la quimioluminiscencia (Tabla 8), los cultivos celulares tratados con adriamicina  $10^{-7}$  M durante nueve días presentaron un aumento del 50% en la producción de malondialdehído, siendo  $56 \pm 9$  y  $107 \pm 10$  pmol/mg de proteína, los valores obtenidos para las células sin tratar cultivadas en presencia de  $10^{-7}$  M de adriamicina respectivamente.

## CAPITULO II

## **METABOLISMO DE HIDROPEROXIDOS EN CELULAS DE MELANOMA MALIGNO HUMANO.**

### **1. Características de los cultivos celulares.**

#### **1.1. Heterogeneidad celular y diferencias en el contenido de melanina en distintas fases del cultivo celular.**

Estas células provienen de la disgregación de un tumor, seguidas de una purificación en Ficoll-Hypaque. Las células así obtenidas se mantuvieron en cultivo desde julio de 1987 (Guerra y col., 1989). Estas células presentan un grado importante de heterogeneidad; por centrifugación en gradiente de densidad en Percoll se separaron en 4 subpoblaciones en base a sus densidades, de 1.04 a 1.07 en subpoblaciones I-IV (Fig 14 a,b). En la fase exponencial del crecimiento la mayor parte de las células pertenecían a la subpoblación III (53%) y presentaron un número importante de células amelanóticas (Fig 14 a). Al alcanzar la fase estacionaria del cultivo el mayor número de células pertenecía a la subpoblación IV (58%) y presentaron una mezcla de diferentes tipos celulares altamente melanóticos (Fig 14 b). El contenido de melanina fue 60% mayor en las células en fase estacionaria comparadas con las células de la fase exponencial (Fig. 15 a, b) y esta correlacionada con la abundancia relativa de las células de la subpoblación IV

. Es interesante observar que la subpoblacion IV fue la mas enriquecida con celulas pigmentadas en ambas fases del cultivo.

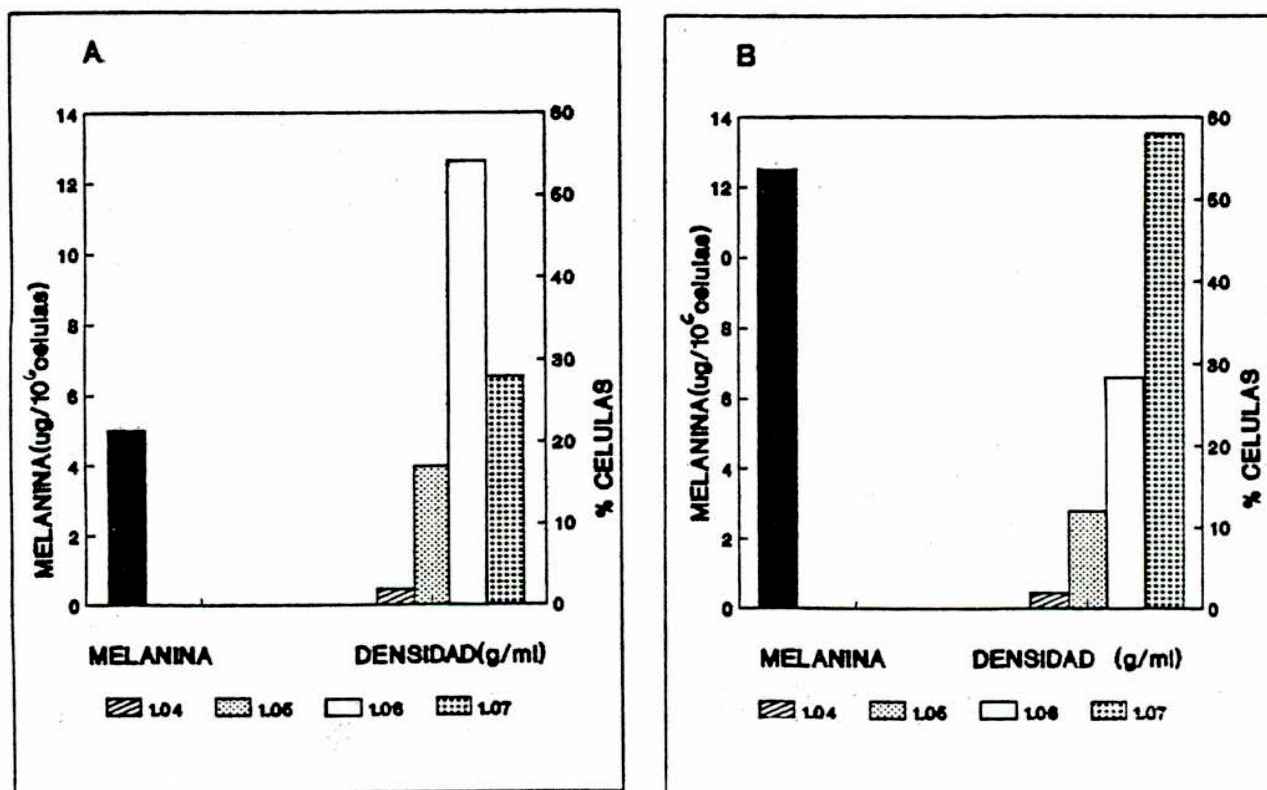


FIG. 14. HETEROGENEIDAD DE LAS CULTIVOS DE CELULAS DE MELANOMA LAS CELULAS SE SEPARARON EN 4 SUBPOBLACIONES DIFERENTES POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD EN PERCOLL. LOS NUMEROS DE I-IV INDICAN LAS DENSIDADES DE LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES (G/ML): 1.04, 1.05, 1.06, 1.07, RESPECTIVAMENTE. EL CONTENIDO DE MELANINA SE DETERMINO COMO SE DESCRIBE EN METODOS Y MATERIALES . A). FASE EXPONENCIAL B). FASE ESTACIONARIA.

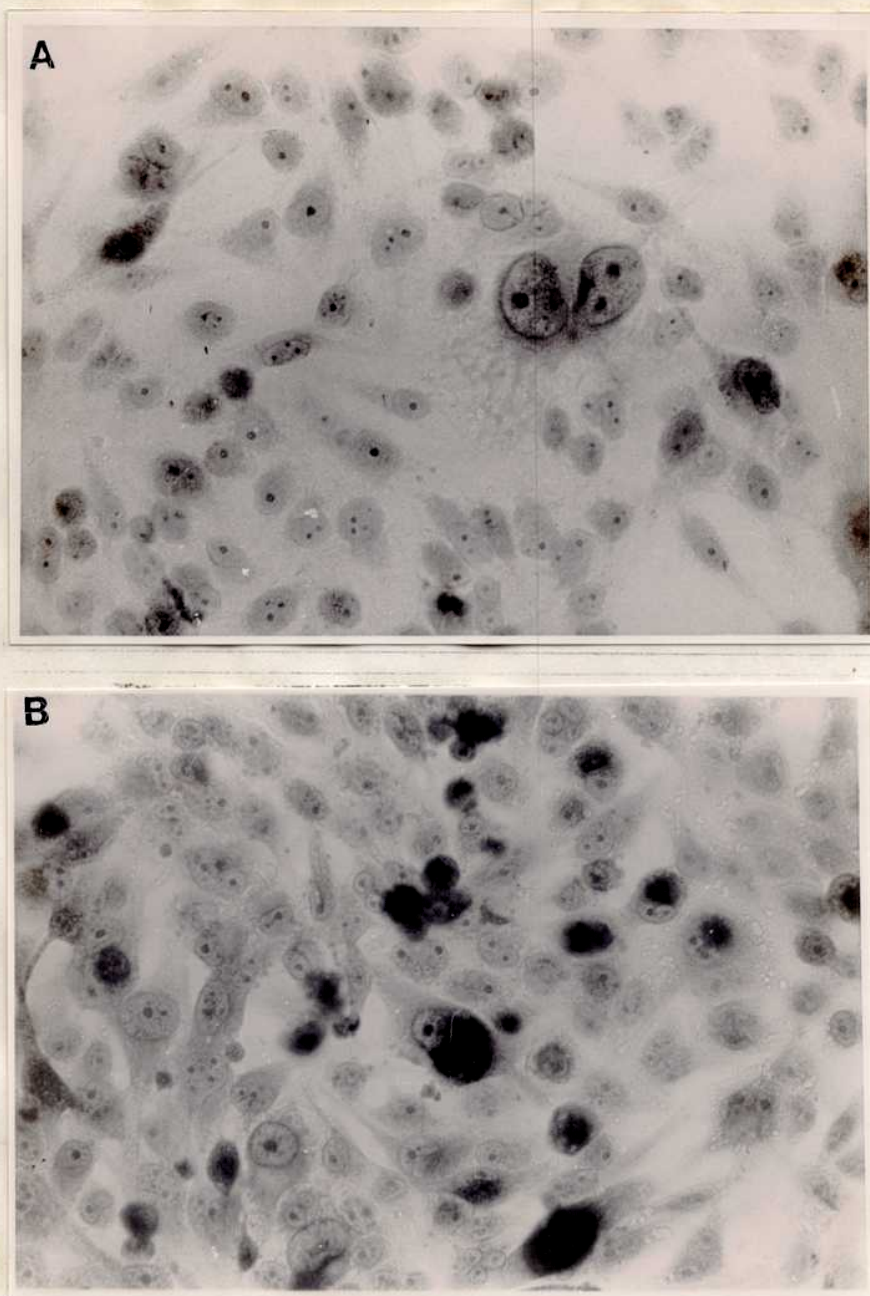


FIG. 15. DETECCIÓN DE MELANINA EN LOS CULTIVOS DE IIB-MEL-J.  
LAS MONOCAPAS DE CELULAS SE LAVARON CON L SOL SALINA Y SE CUBRIERON CON 0.1% DE DIHIDROXIFENILALANINA (DOPA) EN 0.1M DE SOLUCION DE FOSFATOS PH 7.4, DURANTE UNA HORA A 37°C LUEGO LAS CELULAS SE LAVARON CON UNA SOLUCION DE FOSFATO SALINO , SE FIJARON CON 96% DE METANOL A 4°C DURANTE 10 MINUTOS Y SE CONTRASTARON CON HEMATOXILINA DE MAYER, LUEGO SE TOMARON MICROFOTOGRAFIAS .  
A. FASE EXPONENCIAL B. FASE ESTACIONARIA.



## 2. Consumo de oxígeno de las células en fase exponencial y estacionaria del cultivo celular.

Las células en fase exponencial presentaron un aumento importante en el consumo de oxígeno con respecto a las células en fase estacionaria siendo esta diferencia de 55% (Fig 16).

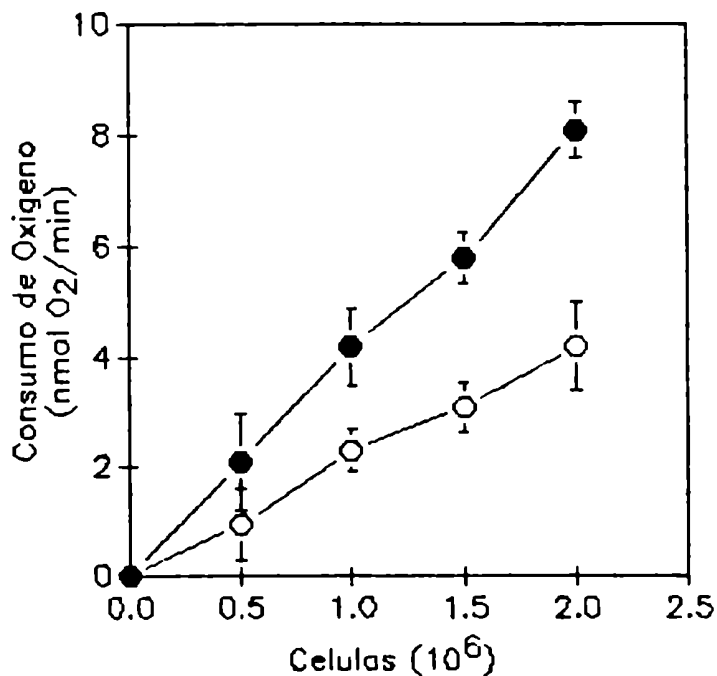


FIG. 16. CONSUMO DE OXIGENO DE LAS CELULA I18-MEL-J EN LAS FASES EXPONENCIAL Y ESTACIONARIA DEL CULTIVO CELULAR.

LAS CELULAS SE COSECHARON Y SE RESUSPENDIERON EN UNA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO SALINO PH 7.4 Y SE LES MIDIO EN CONSUMO DE OXIGENO COLOCANDO DIFERENTES ALICUOTAS EN UN ELECTRODO DE OXIGENO, A 30°C . (●) FASE EXPONENCIAL. (○) FASE ESTACIONARIA.

3. Concentraciones intracelulares de peroxido de hidrogeno en las células en fase exponencial y estacionaria del cultivo.

Los niveles de  $H_2O_2$  determinados en las diferentes alicuotas tomadas a partir del medio libre de células, para las dos fases del cultivo celular mostraron diferencias importantes. La concentración intracelular de  $H_2O_2$  fue 50% mayor en las células de la fase exponencial que en las células de la fase estacionaria (Fig 17).

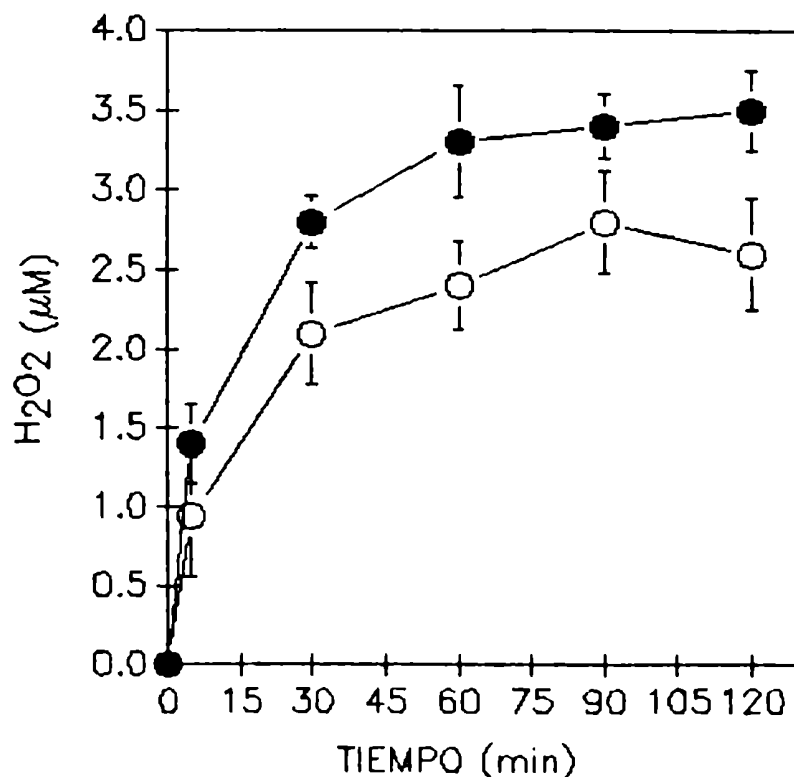


FIG. 17. CONCENTRACIONES DE  $H_2O_2$  EN EL ESTADO ESTACIONARIO EN LAS DOS FASES DE CRECIMIENTO CELULAR. LAS CELULAS SE CULTIVARON DURANTE 5 Y 10 DIAS CON EL OBJETO DE OBTENER CELULAS EN EL ESTADO EXPONENCIAL Y ESTACIONARIO RESPECTIVAMENTE, LUEGO SE LAVARON LAS MONOCAPAS EXTENSIVAMENTE Y SE CUBRIERON CON 3 ml DE SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO-SALINO. AL CABO DE 30, 60, 90, Y 120 SE COLECTARON MUESTRAS DE 0.5 ml Y SE DETERMINO  $H_2O_2$  SEGUN SE DESCRIBE EN METODOS Y MATERIALES. (●) CELULAS EN ESTADO EXPONENCIAL (○) CELULAS EN ESTADO ESTACIONARIO.

#### 4. Niveles de quimioluminiscencia espontanea en las dos fases del cultivo celular

Los niveles en el estado estacionario de las especies excitadas se midieron utilizando un contador de fotones como se describio en metodos y materiales. Los valores obtenidos fueron tambien 50% mayores para las celulas en fase exponencial en comparacion con las celulas en fase estacionaria (Tabla 9).

Tabla 9

#### CONSUMO DE OXIGENO, CONCENTRACION DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN EL ESTADO ESTACIONARIO Y QUIMIOLUMINISCENCIA ESPONTANEA EN CELULAS DE MELANOMA.

LAS CELULAS SE CULTIVARON DURANTE 5 Y 10 DIAS CON EL OBJETO DE OBTENER CELULAS EN FASE EXPONENCIAL Y ESTACIONARIA RESPECTIVAMENTE, UNA VEZ COSECHADAS SE RESUSPENDIERON Y SE LES DETERMINO EL CONSUMO DE OXIGENO, LA CONCENTRACION DE PEROXIDO DE HIDROGENO EN EL ESTADO ESTACIONARIO Y LA QUIMIOLUMINISCENCIA ESPONTANEA.

| Fase de Cultivo | O <sub>2</sub> (nmol/min/10 <sup>4</sup> cel) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (uM) | Quimioluminiscencia (cps/10 <sup>4</sup> celulas) |
|-----------------|---|------------------------------------|---|
| Exponencial     | 4.2±0.8                                       | 3.3±0.2                            | 169±27  |
| Estacionario    | 2.3±0.3 <sup>^</sup>                          | 2.1±0.2 <sup>^</sup>               | 78±24 <sup>^</sup>                                |

<sup>^</sup> SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE LA FASE EXPONENCIAL PARA UN P<0.005  
VALORES SE EXPRESAN COMO PROMEDIOS ± E.S.M.

### 5. Citotoxicidad del peroxido de hidrogeno en las dos fases del cultivo celular.

La proliferacion celular se inhibio despues de una hora de exposicion a una velocidad continua de generacion de  $H_2O_2$ , la cual se obtiene a partir del sistema glucosa-glucosa oxidasa. Los valores obtenidos de  $IC_{50}$  para glucosa oxidasa fueron de 2.4 y 0.9 mU/ml de glucosa oxidasa para las celulas en fase estacionaria y en fase exponencial respectivamente (Fig 18).

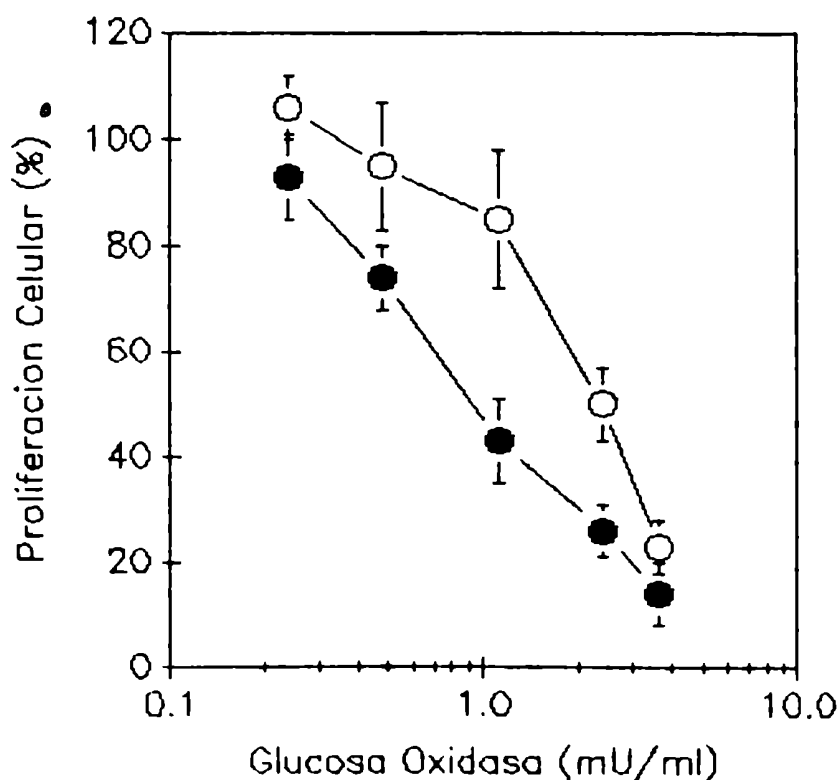


FIG 18. CITOTOXICIDAD DEL PEROXIDO DE HIDROGENO SOBRE LAS CELULAS DE MELANOMA. LAS MONOCAPAS SE EXPUSIERON AL SISTEMA GENERADOR DE  $H_2O_2$  GLUCOSA-GLUCOSA OXIDASA DURANTE 60 MIN AL CABO DE LOS CUALES SE LES VOLVIO A ADICIONAR MEDIO Y SE CULTIVARON DURANTE 72 HORAS MAS EN CONDICIONES NORMALES. LUEGO SE COSECHARON Y SE CONTARON. (O) FASE ESTACIONARIA (●) FASE EXPONENCIAL.

## 6. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en las dos fases de crecimiento del cultivo.

Las actividades enzimáticas de la Cu-Zn superóxido dismutasa, y de la Mn superóxido dismutasa se mantuvieron constantes en las dos fases estudiadas del crecimiento de los cultivos. Lo mismo se observó en los valores de actividad de la enzima glutatión peroxidasa los cuales también fueron similares en la fase exponencial y estacionaria de los cultivos celulares (Tabla 10). Es importante anotar que el medio celular contenía 20 nM de selenito de sodio.

En contraste, los valores obtenidos para la actividad de la enzima catalasa fueron 40% más altos en las células de la fase estacionaria que en las células de la fase exponencial. Un aumento similar de la actividad de catalasa se observó en los homogeneizados totales y en la fracción citosólica (la cual contenía mitocondrias y peroxisomas pero no granulos de melanina) de células de la fase estacionaria al compararlas con las células de la fase exponencial. La actividad de catalasa asociada a los granulos de melanina fue alrededor del 4% de la actividad total de catalasa (Tabla 10).

Tabla 10

**ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CELULAS DE  
MELANOMA**

LAS CELULAS SE CULTIVARON DURANTE 5 Y 10 DIAS CON EL OBJETO DE OBTENER CELULAS EN LA FASE EXPONENCIAL Y ESTACIONARIA RESPECTIVAMENTE, LUEGO LAS CELULAS SE COSECHARON, SE RESUSPENDIERON Y LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS SE DETERMINARON

| Actividad Enzimatica                                     | Exponencial | Fase Estacionaria      |
|--|-------------|------------------------|
| -----  |             |                        |
| Superoxido dismutasa<br>(U/mg proteina)                  |             |                        |
| Cu-Zn-SOD  | 1.89±0.12   | 1.68±0.11 <sup>b</sup> |
| Mn-SOD   | 0.60±0.03   | 0.47±0.06 <sup>b</sup> |
| Glutation peroxidasa <sup>a</sup><br>(mU/mg de proteina) |             |                        |
| Dependiente de Se  | 2.38±0.12   | 1.94±0.28 <sup>b</sup> |
| Independiente de Se                                      | 1.32±0.10   | 1.66±0.15 <sup>b</sup> |
| Catalasa<br>(U/mg proteina)                              |             |                        |
| Homogeneizado  | 4.9±0.1     | 7.0±0.3 <sup>c</sup>   |
| Citosol  | 7.6±0.3     | 10.8±0.6 <sup>c</sup>  |

-----  
<sup>a</sup> GLUTATION PEROXIDASA TOTAL Y DEPENDIENTE DE SE SE DETERMINARON CON HIDROPEROXIDO DE TERT-BUTILO Y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> RESPECTIVAMENTE. <sup>b</sup> NO PRESENTO DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO A LA FASE EXPONENCIAL. <sup>c</sup> DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO A LA FASE EXPONENCIAL PARA UN P<0.005. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO EL PROMEDIO ± E.S.M.

**7. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en tumores melanoticos.**

En la tabla 11 se observan los valores obtenidos para las enzimas antioxidantes presentes en los tumores y en las

celulas despues de varios meses de cultivo. La actividad de catalasa en la muestra tumoral no fue posible de determinar dada la importante contaminacion con sangre.

Tabla 11

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN TUMORES MELANOTICOS

LOS TUMORES SE MACERARON , SE HOMOGENIZARON Y SE SONICARON EN SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 30 mM PH 7.4, LUEGO SE CENTRIFUGARON A 2500 RPM DURANTE 10 MIN. EL SOBRENADANTE SE UTILIZO PARA LA DETERMINACION DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.

| Muestra             | ENZIMAS                |                      |                         |
|---------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
|                     | SOD<br>(U/mg prot)     | GPX<br>(mU/mg prot)  | CATALASA<br>(U/mg prot) |
| Tumores Melanoticos | 1.37±0.32              | 3.5±0.55             | ND                      |
| Celulas IIB-MELJ    | 2.49±0.23 <sup>a</sup> | 3.7±0.1 <sup>b</sup> | 0.048±0.008             |

<sup>a</sup>SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE PARA UN P<0.005. <sup>b</sup> LOS VALORES REPRESENTAN LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA TOTAL, LAS CELULAS SE CULTIVARON EN 20 nM DE SELENITO DE SODIO. LOS VALORES ESTAN CORREGIDOS PARA LA CONTAMINACION ERITROCITARIA.

# CAPITULO III



## EFFECTOS ANTIOXIDANTES DE PREPARACIONES DE MELANINA SINTETICA Y TUMORAL.

### 1. Espectro de las preparaciones de melanina

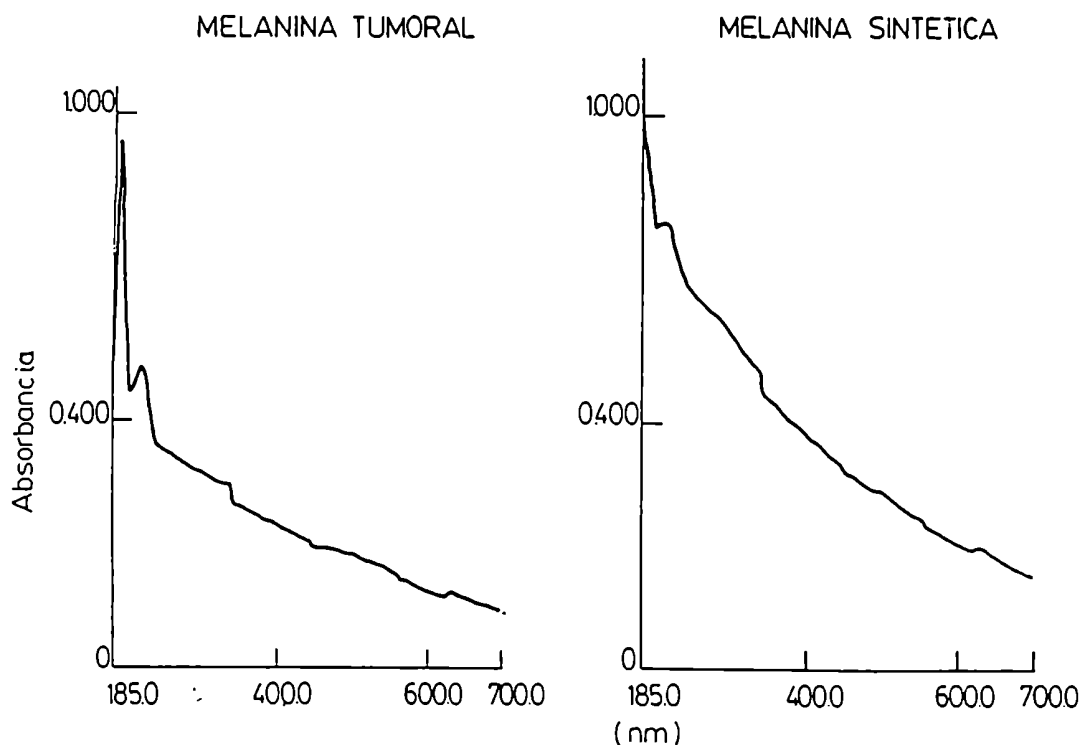


FIG. 19. ESPECTROS ENTRE 185 Y 700 nm PARA LAS DOS PREPARACIONES DE MELANINA  
A. SINTETICA B. TUMORAL

Las preparaciones de melanina sintetica utilizadas provenian de la autooxidacion del DOPA con persulfato, el compuesto asi obtenido ha sido de gran utilidad para estudiar la melanina natural ya que presenta un comportamiento cualitativo y cuantitativo muy similar a las preparaciones de melaninas naturales (Sealy y col., 1980).

Las preparaciones de melanina natural se obtuvieron a partir de tumores de melanoma, en los cuales el polimero de melanoproteina se mantuvo siempre en estado hidratado, no se sometio a ningun tratamiento fuerte. Esto con el objeto de obtener el pigmento en un estado fisiologico similar a su condicion dentro de la celula. Una vez obtenidas las muestras se les realizo un espectro entre 185 y 700 nm, (Fig 19). Las dos muestras presentaron una fuerte absorcion en el rango visible y en el rango ultravioleta, caracteristico de los pigmentos naturales tipo melanina.

## **2. Contenido de $\text{Cu}^{2+}$ en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral.**

Las preparaciones de melanina sintetica no presentaron niveles detectables de cobre; mientras que las preparaciones de melanina tumoral presentaron un contenido de  $\text{Cu}^{2+}$  de  $339 \pm 2$  ng/mg de melanina.

## **3. Efecto de la melanina sintetica y tumoral sobre la lipoperoxidacion de homogeneizados de higado de rata .**

### **3.1. Lipoperoxidacion endogena**

Se determino el efecto del tiempo y la temperatura sobre la lipoperoxidacion endogena de un homogeneizado de higado de rata a traves de la produccion de TBARS (Fig 20).

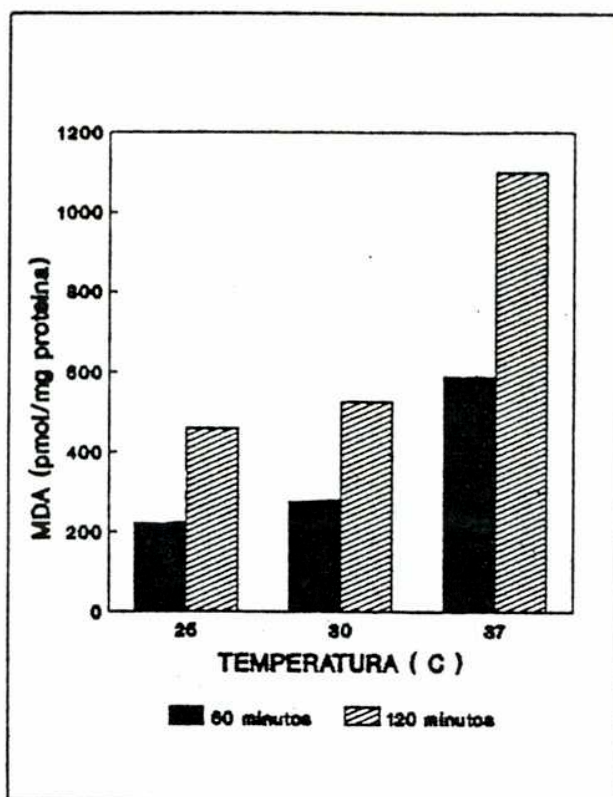


FIG. 20. EFECTO DEL TIEMPO Y DE LA TEMPERATURA EN LA LIPOPEROXIDACION ESPONTANEA DE UN HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA. LOS HOMOGENEIZADOS SE INCUBARON EN UNA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.4 A DIFERENTES TEMPERATURAS: 25°, 30° Y 37°, DURANTE 60 Y 120 MIN AL CABO DE LOS CUALES SE DETERMINO LA PRODUCCION DE TBARS COMO INDICE DE LIPOPEROXIDACION

Cuando se aumento la temperatura de 25°-30°C, se observo un aumento no mayor del 20% en la produccion de TBARS a tiempos cortos de incubacion (60 min) o a tiempos largos (120 min). Mientras que al aumentar la temperatura de 30°-37°C la produccion de TBARS a tiempos cortos (60 min) y a tiempos largos (120 min) aumento un 107% y 90% respectivamente.

El tiempo de incubacion mostro ser un factor importante ya que a las tres temperaturas estudiadas : 25°C, 30°C y 37°C las incubaciones a tiempos a tiempos largos (120 min) mostraron un aumento de 99%, 94% y 80% respectivamente. El calculo de la energia de activacion aparente (E\*) con un

grafico de Arrhenius para obtener la produccion de TBARS con 60 y 120 minutos de incubacion permitio obtener valores de 60.7 y 50.4 kJ/mol respectivamente. Estas energias de activacion aparente para el proceso de lipoperoxidacion concuerdan con los valores obtenidos por Boveris y col. (1983), quienes informaron una energia de activacion de 68 kJ/mol para temperaturas mayores a 37°C en sistemas vegetales. El valor correspondiente para el rango 20°C-37°C fue de 20 kJ/mol.

Para medir el efecto de las dos preparaciones de melanina durante la lipoperoxidacion espontanea se fijaron las condiciones de incubacion de las muestras en 37°C de temperatura y 120 minutos de incubacion.

El agregado de las dos preparaciones de melanina produjo una importante disminucion en los niveles de produccion de TBARS. Los valores de  $IC_{50}$  para la melanina tumoral y sintetica fueron de 5.5 y 2.5 ug/mg de proteina (Fig 21). Estos valores disminuidos de TBARS podrian deberse simplemente a una interaccion o enmascaramiento de los TBARS o del malondialdehido por la melanina, a medida que estos se generan durante la incubacion, y no a un efecto a nivel del proceso de lipoperoxidacion. El agregado de melanina a un homogeneizado previamente incubado a 37°C durante 60 minutos el cual ya tenia TBARS formadas, permitio aclarar en cierta medida la interaccion de la melanina en la determinacion de este compuesto.

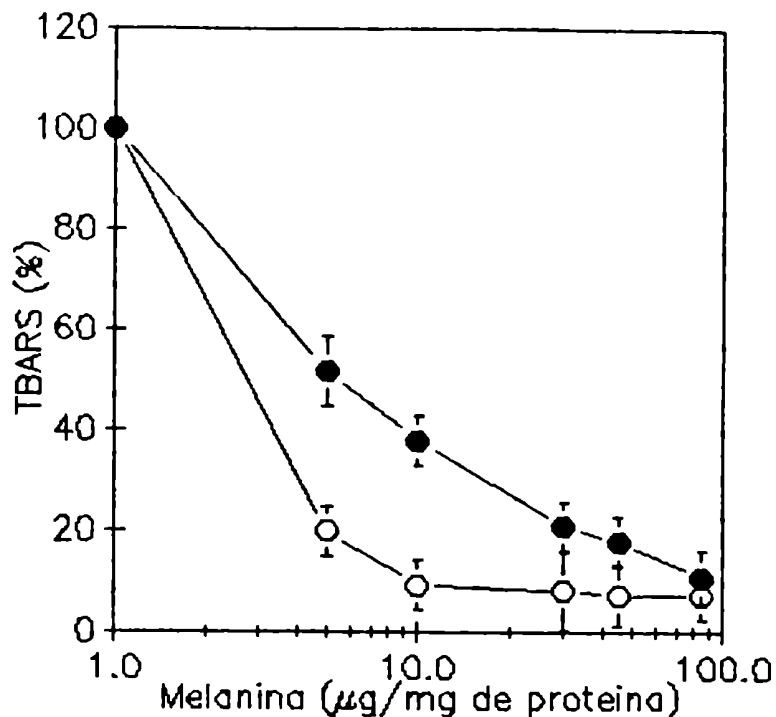


FIG. 21. EFECTO DE LAS PREPARACIONES DE MELANINA SINTETICA Y TUMORAL EN LA LIPOPEROXIDACION ESPONTANEA DE UN HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA. LOS HOMOGENEIZADOS SE INCUBARON EN UNA SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PH 7.4 A DIFERENTES TEMPERATURAS: 25°, 30° Y 37°, DURANTE 60 Y 120 MIN AL CABO DE LOS CUALES SE DETERMINO LA PRODUCCION DE MALONDIALDEHIDO COMO INDICE DE LIPOPEROXIDACION. (○), MELANINA SINTETICA; (●), MELANINA TUMORAL.

La melanina no enmascara a los TBARS, ya que despues de 30 y 60 min de incubacion adicional los niveles existentes previamente al agregado de melanina continuaron presentes en dicho incubado.

El efecto de la melanina en la disminucion de los niveles de TBARS o malondialdehido serian entonces durante el proceso de formacion de estos, o sea a traves de su intervencion en alguna etapa del proceso de lipoperoxidacion (Fig 22).

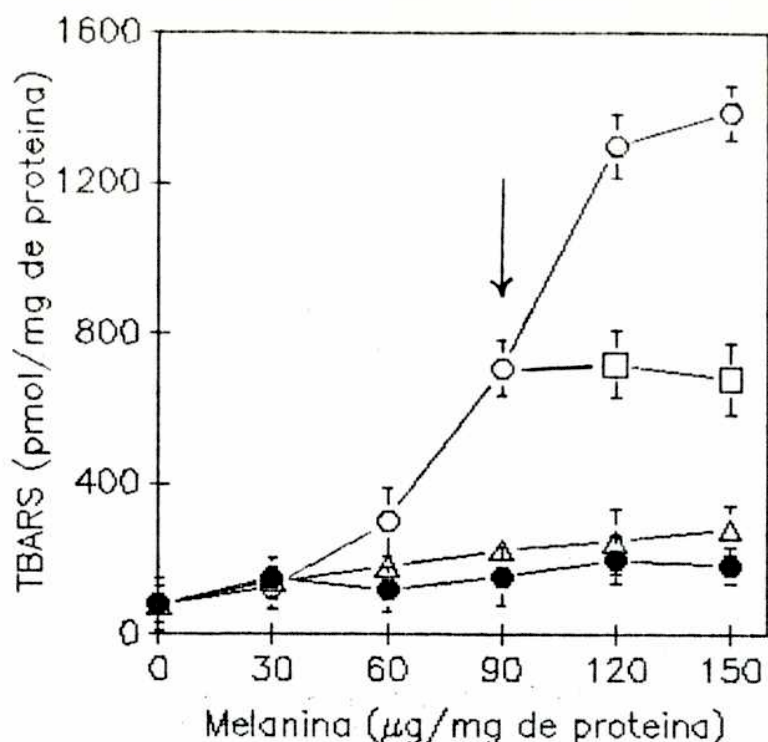


FIG. 22. EFECTO DE LA MELANINA EN LA DETERMINACION DE LOS NIVELES DE TBARS EXPRESADO COMO MALONDIALDEHIDO. SE REALIZARON EXPERIMENTOS EN LOS CUALES SE ADICIONO MELANINA DE LOS DOS TIPOS POR SEPARADO A UN HOMOGENEIZADO LUEGO DE 90 MIN DE TRANSCURRIDA LA INCUBACION (37°C) Y SE DETERMINO LA CONCENTRACION DE MALONDIALDEHIDO AL CABO DE 30 Y 60 MIN DE INCUBACION ADICIONAL. LOS RESULTADOS MUESTRAN QUE LA MELANINA NO ENMASCARA EL MALONDIALDEHIDO FORMADO PREVIAMENTE A SU ADICION Y SI INHIBE SU PRODUCCION TOTALMENTE AL COMPARARLO CONTRA LOS CONTROLES SIN MELANINA. (○) HOMOGENEIZADO; (□) HOMOGENEIZADO CON 20 µg MELANINA SINTETICA/MG DE PROTEINA; (△) HOMOGENEIZADO CON 20 µg DE MELANINA TUMORAL/MG DE PROTEINA; (●) PREVIAMENTE INCUBADO DURANTE 90 MIN A 37°C ANTES DE AGREGADA LA MELANINA.

Se observo durante los primeros 30 minutos de incubacion una inhibicion del consumo de oxigeno a medida que aumentaba la concentracion de melanina. El consumo de oxigeno fue constante durante los primeros 30 min para cada una de las concentraciones de melanina utilizadas. La relacion de produccion de [TBARS] /consumo de oxigeno [O<sub>2</sub>] para los procesos de lipoperoxidacion espontanea (Tabla 12) en ausencia de melanina fue de 0.038, mientras que en presencia de melanina sintetica (40 µg/mg de proteina) fue de 0.013, y en presencia de melanina tumoral (40 µg/mg de

proteína) fue de 0.034, a pesar de la importante disminución en MDA que se observa en la figura 22.

### 3.2. Lipoperoxidación iniciada por hidropéroxido de *ter*-butilo.

El propósito de estos experimentos consistió en la determinación del efecto de preparaciones de melanina sintética y tumoral frente a procesos de lipoperoxidación iniciados por hidropéroxido de *ter*-butilo sobre homogeneizados de hígado de rata. Este proceso se cuantificó como en los casos anteriores a través de la determinación de la producción de TBARS o malondialdehído y se realizaron determinaciones del consumo de oxígeno durante 30 minutos de incubación con el hidropéroxido y las diferentes concentraciones de melanina.

La preparación de melanina sintética produjo como en el sistema anterior (lipoperoxidación endógena) una clara inhibición de la producción de TBARS; siendo la IC<sub>50</sub> de 30 µg/mg de proteína, mientras que las preparaciones de melanina tumoral no mostraron ningún tipo de inhibición en la producción de TBARS (Fig 23).

Tabla 12

EFFECTO DE LA MELANINA EN LA RELACION [TBARS]/[O<sub>2</sub>] DURANTE LA LIPOPEROXIDACION ESPONTANEA DE HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA

---

| MUESTRA          | MELANINA<br>(µg/mg prot) | -d[O <sub>2</sub> ]<br>dt<br>(µM/min) | +d[TBARS]<br>dt<br>(µM/min) | +d[TBARS]/dt x 100<br>-d[O <sub>2</sub> ]/dt |
|------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--|
| Homogeneizado    |                          | 2.6                                   | 1.10 <sup>-3</sup>          | 0.038  |
| " + M. SINTETICA | 20                       | 2.3                                   | 5x 10 <sup>-4</sup>         | 0.022  |
| " + "            | 40                       | 2.15                                  | 0.03x10 <sup>-4</sup>       | 0.013  |
| " + M. TUMORAL   | 20                       | 2.1                                   | 9x 10 <sup>-4</sup>         | 0.042  |
| " + "            | 40                       | 1.9                                   | 0.06x10 <sup>-4</sup>       | 0.034  |

---

El consumo de oxigeno asociado a la lipoperoxidacion iniciada por hidropoxido de ter-butilo fue ligeramente disminuido con un efecto del (9.4/11.6)% por la melanina sintetica. En el caso de la melanina tumoral hubo un ligero aumento del consumo de oxigeno (11.6/13.5)% (Tabla 13). La relacion [TBARS]/[O<sub>2</sub>] para la lipoperoxidacion de los homogeneizados iniciada por hidropoxido de ter-butilo fue de 0.18.



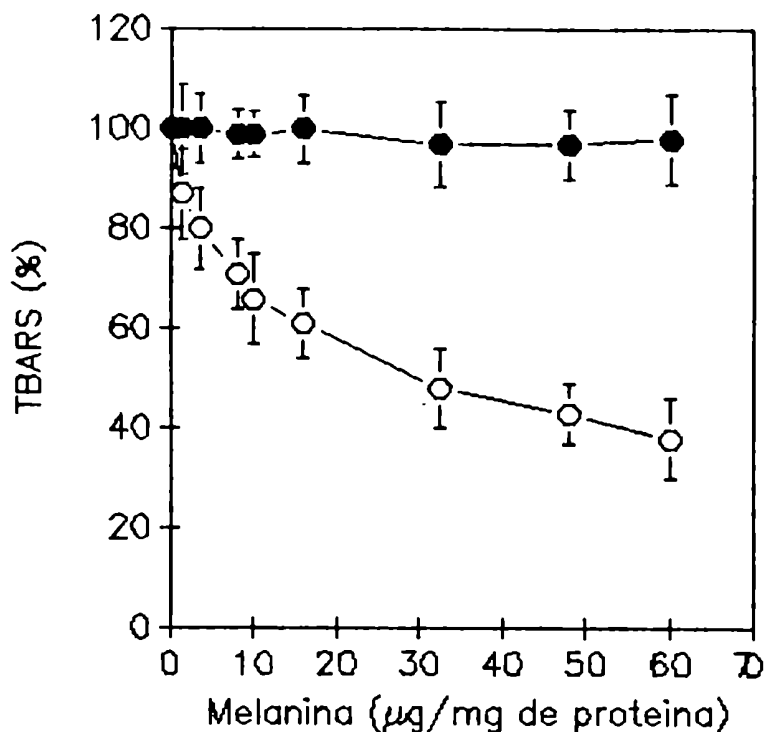


FIG. 23. EFECTO DE LAS PREPARACIONES DE MELANINA DURANTE LA LIPOPEROXIDACION INICIADA POR HIDROPEROXIDO DE TER-BUTILO SOBRE HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA. EL PROCESO SE INICIO POR EL AGREGADO DE 3MM DE TERT-BUTILO A LOS HOMOGENEIZADOS CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MELANINA, SEGUIDO DE INCUBACION A 37°C DURANTE 30 MINUTOS. AL CABO DE LOS CUALES SE DETERMINO LA PRODUCCION DE MDA.

(●), MELANINA SINTETICA; (○), MELANINA TUMORAL.

Se observo una disminucion en esta relacion con el aumento de la concentracion de melanina sintetica adicionada (Tabla 13). La misma relacion no fue afectada significativamente por la adicion de melanina tumoral.

Tabla 13

EFFECTO DE LA MELANINA EN LA RELACION [TBARS]/[O<sub>2</sub>] DURANTE LA LIPOPEROXIDACION INICIADA POR HIDROPEROXIDO DE TER-BUTILO EN HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA.

| MUESTRA                          | MELANINA<br>(µg/mg prot) | -d[O <sub>2</sub> ]<br>dt<br>(µM/min) | +d[TBARS]<br>dt<br>(µM/min) | +d[TBARS]/dt x 100<br>-d[O <sub>2</sub> ]/dt |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--|
| Homogeneizado<br>+ hidroperoxido | --                       | 11.6                                  | 0.021                       | 0.18   |
| " + M. sintetica                 | 5                        | 10.0                                  | 0.016                       | 0.14   |
| " + "                            | 20                       | 9.8                                   | 0.012                       | 0.12   |
| " + "                            | 40                       | 9.7                                   | 0.010                       | 0.10   |
| " + "                            | 60                       | 9.4                                   | 0.008                       | 0.085  |
| " + "                            | 80                       | 9.4                                   | 0.006                       | 0.063  |
| " + M. tumoral                   | 5                        | 11.8                                  | 0.021                       | 0.17   |
| " + "                            | 20                       | 12.7                                  | 0.021                       | 0.16   |
| " + "                            | 40                       | 13.1                                  | 0.021                       | 0.16   |
| " + "                            | 60                       | 13.0                                  | 0.021                       | 0.16   |
| " + "                            | 80                       | 13.5                                  | 0.021                       | 0.15   |
| " + "                            | 90                       | 13.5                                  | 0.021                       | 0.15   |

EL CONSUMO DE OXIGENO SE DETERMINO DURANTE LOS PRIMEROS MINUTOS DE INICIADA LA REACCION CON EL HIDROPEROXIDO DE TER-BUTILO; ESTE FUE CONSTANTE HASTA LOS 30 MINUTOS Y LUEGO COMENZO A DECAER.

### **3.3. Lipoperoxidacion iniciada por 2,2-azobis 2amidino- propano dihidrocloruro (AAPH).**

Se utilizo al 2,2-azobis(2amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) como iniciador de la reaccion de lipoperoxidacion, debido a que puede generar radicales libres a velocidades conocidas y constantes por efecto de la temperatura.

Estos ensayos se realizaron sobre homogeneizados de higado de rata incubados con AAPH en una concentracion de 80  $\mu$ M a 38°C durante 120 min. Las preparaciones de melanina sintetica mostraron tambien en este sistema una clara inhibicion de la produccion de TBARS, siendo la IC<sub>50</sub> de las preparaciones de melanina sintetica y tumoral 120 y 500  $\mu$ g/mg de proteina respectivamente (Fig 19). A diferencia de los resultados obtenidos con hidroperoxido de ter-butilo como iniciador, la melanina tumoral si inhibio la produccion de TBARS (Fig 24).

### **4. Actividades enzimaticas presentes en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral**

Se determino la actividad de superoxido dismutasa presente en las preparaciones de melanina sintetica y tumoral, a traves de la autooxidacion de la adrenalina en medio alcalino.

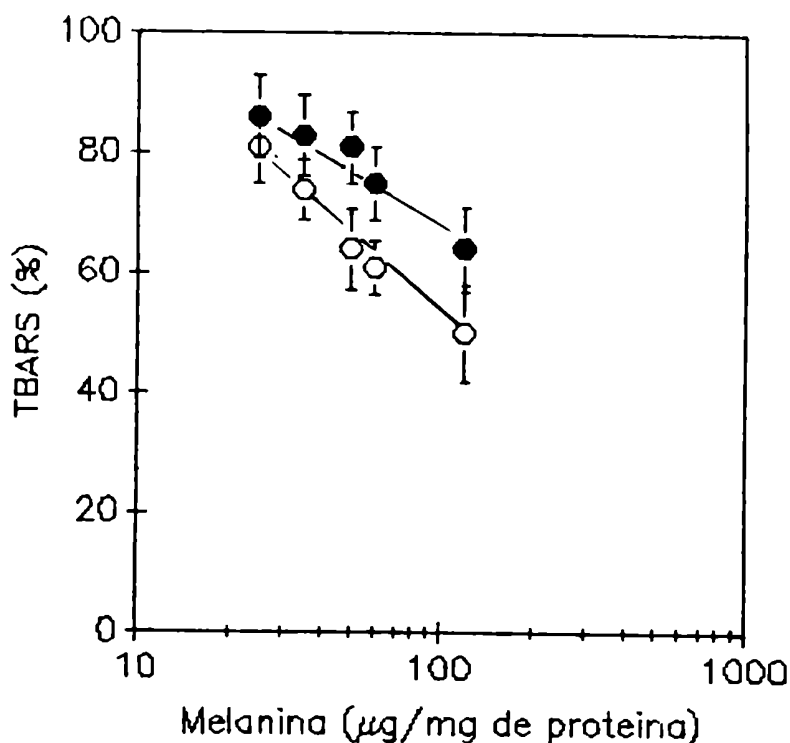


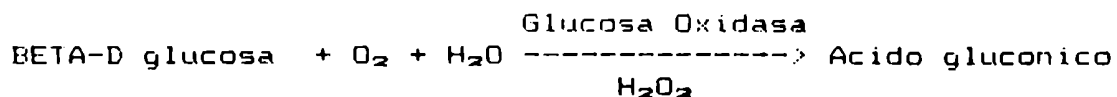
FIG 24. EFECTO DE LAS PREPARACIONES DE MELANINA DURANTE LA LIPOPEROXIDACION INICIADA POR AAPH SOBRE HOMOGENEIZADOS DE HIGADO DE RATA. EL PROCESO SE INICIO POR EL AGREGADO DE AZO-COMPUESTO A LOS HOMOGENEIZADOS CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MELANINA SEGUIDO DE INCUBACION A 30°C DURANTE 120 MINUTOS, LUEGO SE DETERMINO MDA EN LOS DISTINTOS INCUBADOS (○) MELANINA SINTETICA, (●) MELANINA TUMORAL.

Los ensayos realizados con preparaciones de melanina sintética presentaron una inhibición lineal para concentraciones de melanina entre 0 y 13 µg/ml, a concentraciones mayores se perdía la linealidad. Para preparaciones de melanina tumoral la inhibición se mantuvo lineal para concentraciones de melanina entre 0 y 26 µg/ml; a concentraciones mayores también se perdió la linealidad. Los valores obtenidos para el 50% de inhibición de la formación de adrenocromo definen una actividad de 10 U de SOD/mg de melanina para la preparación de melanina tumoral y de 20 U de SOD/mg de proteína para la melanina sintética. La actividad de catalasa se midió en las dos

preparaciones de melanina. La melanina sintetica no mostro actividad detectable de catalasa en las condiciones utilizadas. Las preparaciones de melanina tumoral mostraron actividad equivalente a 0.73 pmoles de catalasa/mg de melanina. Sin embargo esta actividad fue inhibida por 0.1 mM de azida y por tratamiento previo de las preparaciones de melanina tumoral con HCl 6N por 48 horas. La perdida de la actividad de catalas de las preparaciones indica que esta melanina estaba arrastrando catalasa de las celulas. La actividad de catalasa detectada en los granulos de melanina fue del orden de 4-5% de la catalasa total configurando un caso de contaminacion. Ninguna de las dos preparaciones de melanina presento actividad de glutatión peroxidasa.

##### **5. Efecto de las preparaciones de melanina tumoral y sintetica sobre la inhibicion de la enzima glucosa oxidasa por 2,2 azobis (amidinopropano) dihidrocloruro.**

Como se indico anteriormente el AAPH es capaz de generar radicales alquilos los cuales producen la inactivacion del 50% de la actividad de la enzima glucosa oxidasa en las condiciones antes fijadas a traves de la modificacion de los residuos de triptofano. Esta enzima cataliza la siguiente reaccion:



La melanina sintetica y tumoral mantienen la actividad de la enzima glucosa oxidasa ejerciendo un efecto protector contra los radicales libres generados a partir del 2,2 azobis (amidinopropano), siendo los valores de la actividad de la enzima en condiciones normales ( $18.7 \pm 0.35$ ) similares a los obtenidos en presencia de los dos tipos de melanina  $17.4 \pm 0.5$  y  $15.2 \pm 0.6$  para la preparacion sintetica y tumoral respectivamente (Tabla 14). La concentracion de melanina que protege el 50% de inhibicion de la actividad enzimatica fue de 300 y 350 ug/mg de proteina para las preparaciones de melanina sintetica y tumoral respectivamente (Tabla 14).

TABLA 14

EFFECTO DE LA MELANINA TUMORAL Y SINTETICA SOBRE LA INHICION DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA POR 2,2-AZOBIS(AMIDINOPROPANO)

SE DETERMINO LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA A TRAVES DEL CONSUMO DE OXIGENO OBTENIDO DESPUES DE INCUBAR DURANTE 60 MINUTOS A 38°C PH 7.2 LA ENZIMA CON AAPH Y LAS DIFERENTES PREPARACIONES DE MELANINA.

| ADITIVOS                                   | ACTIVIDAD                 |
|--|---------------------------|
|  | (uM O <sub>2</sub> / min) |
| G.oxidasa                                  | 18.7± 0.4                 |
| " + AAPH                                   | 9.3± 0.4                  |
| " + Melanina S.<br>(300 ug/mg de proteina) | 17.6±0.9                  |
| " + Melanina T.<br>(350 ug/mg de proteina) | 15.8±0.4                  |
| " + Melanina S. +<br>AAPH (15mM)           | 17.4±0.5                  |
| " + Melanina T. +<br>AAPH (15 mM)          | 15.2±0.6                  |

# CAPITULO IV



## CAPITULO IV

### DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE CORTEZA ADRENAL DE RATA.

Se incluyeron en este trabajo sobre metabolismo de hidroperoxidos en celulas tumorales en cultivo algunos estudios preliminares sobre cultivos primarios, con el objeto de compararlo con celulas normales en cultivo. Con este fin se usaron celulas de corteza adrenal de rata.

El desarrollo de tecnicas para la preparacion de suspensiones primarias de celulas viables utilizando la accion de diferentes enzimas como colagenasa, hialuronidasa, y DNasa seguida de una suave dispersion mecanica ha permitido la preparacion de cultivos primarios de diferentes tipos de celulas y la busqueda de medios apropiados para su cultivo. El aislamiento de poderosos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento fibroblastico (FGF) y el factor de crecimiento epidermico (EGF), han hecho posible el crecimiento por tiempo prolongado de muchos tipos celulares en cultivos masivos, asi como el clonaje de dichas celulas. Utilizando estas tecnicas se obtuvieron cultivos primarios de celulas de zona glomerulosa de adrenal de rata.

FOYSA

**1. Cultivos primarios de células de zona glomerulosa de corteza adrenal de rata: observaciones morfológicas.**

Aproximadamente el 50% de las suspensiones celulares de la zona glomerulosa se lograron pegar a las placas de cultivo dando monocapas compuestas de  $0.2-0.5 \times 10^6$  células en donde el 90 % consistía de células epiteliales que contenían una gran cantidad de gotitas de grasa refringentes y escasos granulos oscuros. Las células fibroblásticas consistían al comienzo alrededor del 1% de la población pero proliferaban y algunas veces sobrepasaban totalmente las monocapas de células adrenales después de la primera semana de cultivo (Fig. 25).

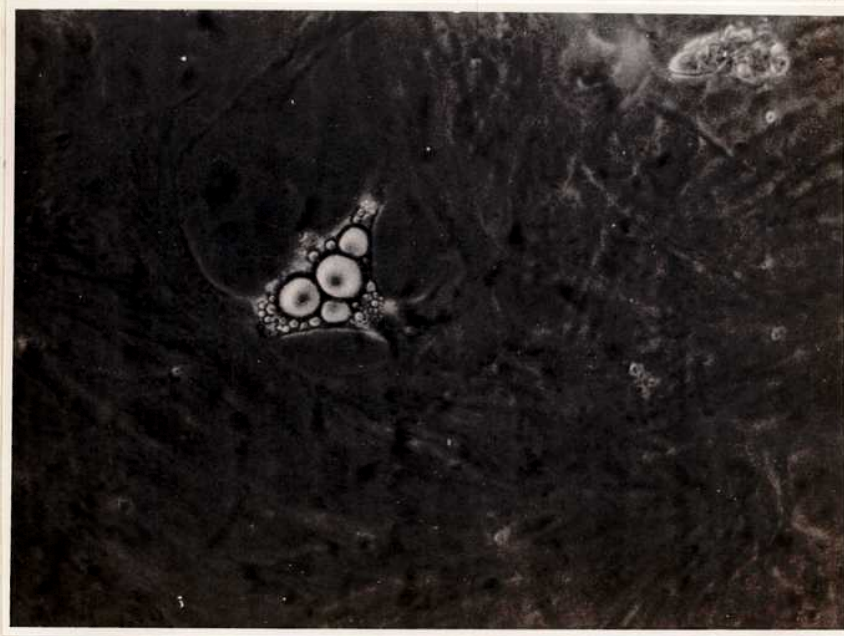


FIG. 25. MICROFOTOGRAFIA DE UNA CELULA DE ZONA GLOMERULOSA DE ADRENAL DE RATA A LOS 6 DIAS DE CULTIVO; EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS SOBREPASO EL CULTIVO DE LAS CELULAS ADRENALAS.

Una de las características morfológica de estas células de la zona glomerulosa de adrenal de rata consistía en la aparición de un gran número de gotitas refringentes a partir de las 72 horas de cultivo, exocitándose algunas de ellas al medio. Estas gotas refringentes se mantenían hasta los 15-20 días de cultivo. (Fig. 26 a)

Se realizaron tinciones de estas estructuras con Oil Red dando positivo para las células adrenales y negativo para las zonas de crecimiento fibroblástico.

A medida que aumentaba el tiempo de cultivo 25-30 días las células de glomerulosa fueron experimentando una retracción con pérdida de gran parte de las gotitas refringentes, con ensanchamiento del citoplasma y un aumento en el contenido de granulos oscuros (lipofushina), adquiriendo características de las células de fasciculata y reticularis, (Fig. 26 b). Este cambio de las características ocurre en la misma población celular. Cambios similares se obtuvieron por el agregado de ACTH (100 mU/ml) no importando el tiempo de cultivo.

## **2. Niveles de las enzimas antioxidantes en células de zona glomerulosa de corteza adrenal de rata.**

### **2.1. Actividad de las enzimas antioxidantes presentes en tejido de zona glomerular.**

Los niveles de las enzimas antioxidantes se midieron en homogeneizados de capsulas de corteza adrenal que contenían

---

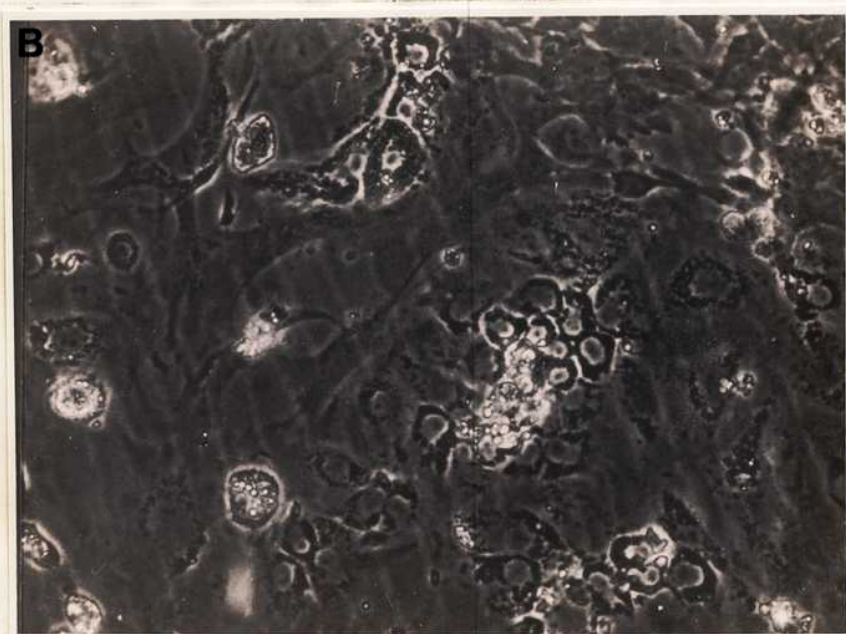
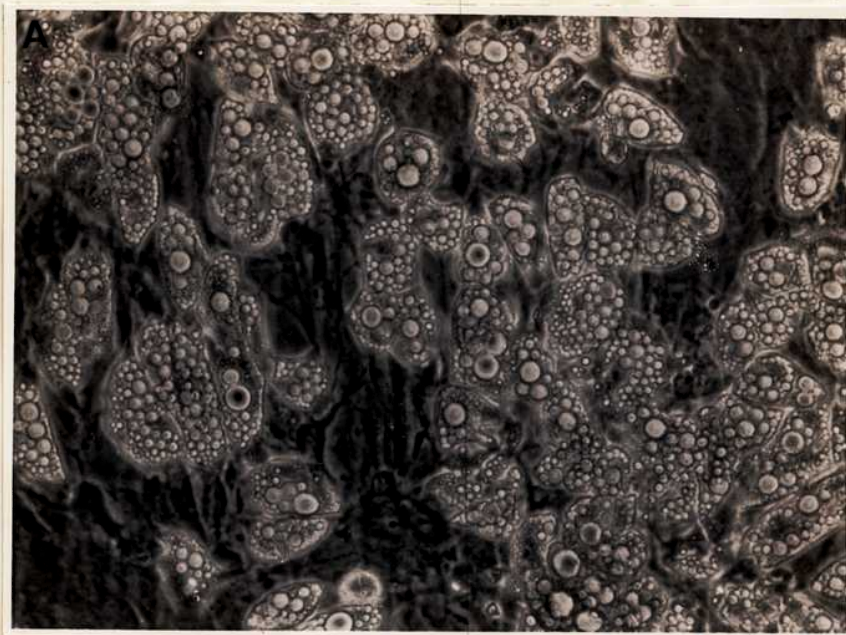


FIG. 26 A. MICROFOTOGRAFÍAS DE MONOCAPAS CELULARES PROVENIENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE LA ZONA GLOMERULOSA DE ADRENAL DE RATA DE 10 DIAS DE CRECIMIENTO. LA SUPERFICIE CELULAR SE ENCUENTRA OCUPADA EN SU TOTALIDAD POR GOTITAS REFRINGENTES. 26 B. MICROFOTOGRAFÍAS DE MONOCAPAS CELULARES PROVENIENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS DE LA ZONA GLOMERULOSA DE ADRENAL DE RATA DE 25 DIAS DE CRECIMIENTO, SE OBSERVA UNA PERDIDA DE LAS GOTITAS REFRINGENTES Y AUMENTO DE LOS GRANULOS OSCUROS (LIPOFUSHINA)

aproximadamente 98% de células de glomerulosa y 2% de células de fasciculata-reticularis, ello determinado por tinción con hematoxilina-eosina.

Las actividades de Cu-Zn superóxido dismutasa y Mn-superóxido dismutasa en estas células de glomerulosa fueron  $9.45 \pm 0.6$  y  $3.15 \pm 0.4$  U/mg de proteína respectivamente. Los valores obtenidos para la glutatión peroxidasa y catalasa fueron de  $43 \pm 0.008$  mU/mg de proteína y  $0.26 \pm 0.02$  U/mg proteína respectivamente.

## **2.2. Efecto del suero y del selenio en los niveles de las enzimas antioxidantes.**

Se determinaron los niveles de las enzimas antioxidantes en células provenientes de dos subcultivos que fueron mantenidos durante tres días en medio Dulbecco/F12 (1:1) y en presencia y ausencia de 10% de suero fetal bovino. Las células cultivadas en presencia y ausencia de 10% de suero fetal bovino mostraron un 41% y 22% de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa presente en el tejido adrenal fresco. Las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa no mostraron diferencias significativas con las células de tejido fresco (Tabla 15).

El efecto del selenio se investigó en las mismas células después de dos subcultivos mantenidos durante tres días en medio Dulbecco/F12 (1:1) 10% de suero fetal bovino con y sin el agregado de 20nM de selenito de sodio. La tabla 10

muestra que la actividad de la glutatión peroxidasa se restablece a los valores presentes en el tejido adrenal fresco despues de la adición de 20 nM de selenito de sodio en los cultivos tanto en presencia como en ausencia de 10% de suero fetal bovino.

TABLA 15

EFFECTO DE DIFERENTES AGENTES EN LOS NIVELES DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PRESENTES EN CELULAS DE ZONA GLOMERULOSA DE CORTEZA ADRENAL DE RATA

SE UTILIZARON CELULAS PROVENIENTES DE DOS SUBCULTIVOS, CULTIVADAS DURANTE TRES DIAS EN PRESENCIA DE DIFERENTES ADITIVOS, AL CABO DE LOS CUALES SE COSECHARON Y SE DETERMINARON LOS NIVELES DE ENZIMAS SEGUN SE INDICA EN METODOS Y MATERIALES.

| CONDICIONES   | ENZIMAS                           |                                   |                       |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
|   | Superoxido dismutasa <sup>a</sup> | Glutation peroxidasa <sup>a</sup> | Catalasa <sup>a</sup> |
| Tejido adrenal fresco   | 12.6±1.3                          | 43±0.008                          | 0.26±0.02             |
| Zona glomerulosa  | 11.5±0.7                          | 18±0.003                          | 0.18±0.007            |
| Zona glomerulosa ausencia de suero  | 11.4±0.8                          | 10±0.003                          | 0.22±0.04             |
| Zona glomerulosa mas 20 nM SeO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>                   | 12.0±0.8                          | 55±0.001                          | 0.24±0.03             |
| Zona glomerulosa ausencia de suero mas 20 nM SeO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> | 11.5±2.0                          | 49±0.008                          | 0.23±0.007            |

<sup>a</sup>LA ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y DE CATALASA (UNIDADES BEAUDHUIJN) SE EXPRESA EN U/mg DE PROTEINA, LA ACTIVIDAD DE GLUTATION PEROXIDASA SE EXPRESA EN mU/mg DE PROTEINA.

# DISCUSSION

## DISCUSION

### 1. Consideraciones generales

Las células se encuentran constantemente sometidas a la acción de agentes que pueden perturbar su estado estacionario. Un estrés oxidativo puede resultar cuando la naturaleza, la intensidad y/o la duración de los estímulos generados por los agentes oxidantes cambia de tal forma que ya no puede ser considerada como fisiológica. Las especies de oxígeno activo ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  y  $^1O_2$ ) a pesar de ser naturales en las células, pueden causarles estrés oxidativo. Estas especies de oxígeno activo (en concentraciones no letales (fisiopatológicas) podrían funcionar como mediadores del crecimiento, diferenciación y desarrollo celular a través de modificaciones de los mecanismos de respuesta intracelular como alteraciones en las concentraciones de  $Ca^{+2}$  intracelular (Cerutti y col., 1989), aumento del binding y activación a protein quinasa c (CPK) (Larsson y Cerutti, 1989), aumento de la ruptura a DNA (Cantoni y col., 1989), aumento en los procesos de poli-ADP-ribosilación de proteínas nucleares (Krupitza y Cerutti, 1989), expresión de distintos oncogenes (Muehlematter y col., 1989; Amstad y Cerutti, 1990). Esta capacidad de modificar la respuesta celular llevaría finalmente a una modulación de la expresión genica, pudiendo así actuar como iniciadores, promotores y progresores en los procesos tumorales.



La alteracion de estos eventos en las distintas etapas multisequenciales del proceso canceroso , asi como el efecto de diferentes tipos de compuestos sobre las celulas tumorales ya establecidas los cuales interaccionan o generan especies de oxigeno activo, podrian determinar la eficacia de algunas de las diferentes terapias anticancerigenas.

## **2. Metabolismo de hidroperoxidos en celulas de cancer mamario humano.**

Nuestro proposito inicial fue investigar el efecto del selenio en los cultivos de carcinoma de mama (MCF-7), dado que este micronutriente es esencial para el crecimiento de las celulas de los mamiferos (Ganther y col., 1976). Este requerimiento es debido a que el selenio es un componente esencial del centro activo de la glutathion peroxidasa (Combs y col., 1975, Hockstra y col., 1975; Chance y col., 1979 y Flohe, L., 1982), teniendo esta enzima papel importante en la detoxificacion de los peroxidos inducidos por radicales del oxigeno.y debido a su conocido efecto anticancerigeno (Batist y col., 1985).

La deficiencia de selenio debida a la ausencia de suero en los cultivos de MCF-7 no afecto el crecimiento celular y si produjo un descenso en los niveles de la enzima glutathion peroxidasa. Esto nos llevaria a pensar que la glutathion peroxidasa en los niveles encontrados despues de 20 dias en

ausencia de suero ( $2.0 \pm 0.3$   $\mu\text{U}/\text{mg}$  de proteina) son suficientes para el crecimiento de estas células. Por el contrario concentraciones entre  $10^{-9}$ - $50^{-9}$  M de selenito de sodio presentaron una inhibición de la proliferación celular mayor al 50%; estos resultados podrían indicar que el selenio ejerce su efecto inhibitorio a través de mecanismos independientes de la enzima glutatión peroxidasa. Desde hace 30 años se sabe que dosis altas de selenio ( $4 \times 10^{-3}$  M) son tóxicas para las células e inhiben varios sistemas enzimáticos (Klug y col., 1953). Los datos reportados por Medina y col., (1983) en los cuales la incidencia de tumores de mama inducidos por DMBA (dimetil-benzantraceno) después de la administración en la dieta de 0.2-2 nM de selenio a ratas, fue de 56% y 16%, mostraron que la acción preventiva del selenio no estaría relacionada con los niveles de glutatión peroxidasa ya que tanto los controles (sin selenio en la dieta) como los que reciben 0.2 y  $2 \times 10^{-9}$  M de selenio presentaron niveles bajos de la enzima glutatión peroxidasa; estos resultados estarían relacionados con nuestros resultados, ya que muestran una inhibición de la aparición de tumores con concentraciones similares con las se obtuvo una inhibición de la proliferación celular.

Batist y col. (1986), utilizaron la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 en las cuales la adición de distintos componentes de selenio mostraron una habilidad diferente para inhibir la proliferación de esta línea tumoral (1-50  $\mu\text{M}$ ), siendo el selenito de sodio y la

selenocistina (1-50  $\mu\text{M}$ ) los que mostraron un mayor efecto inhibitorio, asociado este a una disminucion del glutathion intracelular. En segundo termino utilizamos una droga especifica contra el carcinoma de mama, la adriamicina. Esta droga ejerce su efecto toxico sobre las celulas tumorales a traves de su intercalacion y alquilacion de la molecula de DNA impidiendo asi la division celular (Di Marco y col., 1975, 1982) y a traves de la produccion de radical superoxido durante el ciclo redox de la porcion de quinona de la molecula de antraciclina (Bachur y col., 1978)

La generacion de especies de oxigeno activo aumenta la velocidad de lipoperoxidacion y de dafio al DNA (Doroshov y col., 1983; Thayer y col., 1977; Myers y col., 1977; Bates y col., 1982). Los primeros efectos citotoxicos observados en los cultivos celulares hechos en presencia de adriamicina fueron una inhibicion de la division celular, un obscurecimiento celular debido a la entrada del colorante azul trypan, simultaneamente con un aumento en el tamaño de las celulas, probablemente debido a un efecto de hinchamiento producido por el estres oxidativo. Las celulas de tumor de mama se cultivaron durante 9 dias en presencia de  $10^{-7}$  M de adriamicina mostrando un aumento sustancial en la quimioluminiscencia espontanea, en la respiracion no sensible a cianuro, en la produccion de sustancias reactivas al tiobarbiturico (TBARS) y en las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el estado estacionario. Esto indicaria un aumento en la produccion de las especies de oxigeno activo las cuales

iniciarían reacciones en cadena de peroxidación cuyos productos excitados (carbonilos en estado triplete y oxígeno singulete) serían los responsables del aumento en la quimioluminiscencia (fotones emitidos durante el proceso de desexcitación). Es interesante anotar que esta es el primer informe sobre la determinación de la quimioluminiscencia de células intactas cultivadas en monocapas. Los reportes anteriores se refirieron a suspensiones celulares de protozoos como *A. Castelani* (Lloyd y col., 1979) *T. Cruzi* (Giulivi y col., 1988) y hepatocitos (Turrens y col., 1986). Este ensayo parece aplicable a cultivos celulares a los cuales se les ha aplicado un estrés oxidativo. Además los resultados obtenidos con cianuro mostrarían el aumento en el consumo de oxígeno debido al ciclo redox de la adriamicina y podría ser interpretado como una medida de los niveles de producción de las especies de oxígeno activo los cuales estarían estrechamente relacionados con los resultados de quimioluminiscencia, producción de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico y con las concentraciones en el estado estacionario de  $H_2O_2$ . Los valores de  $IC_{50}$  para la adriamicina en los cultivos de tumor de mama fueron de 30 nM los cuales estarían cerca del valor  $IC_{50}$  5-7 nM obtenido por Mimmaugh y col., (1989). El crecimiento de las células con concentraciones normales y bajas de glutatión peroxidasa fueron igualmente inhibidas por la adriamicina, observándose así que la respuesta in vitro de las células de tumor de mama es diferente de los resultados obtenidos in

vivo en los cuales la deficiencia en glutatión peroxidasa aumento la toxicidad de la adriamicina en el corazón. Es interesante el hecho aunque aun no muy claro la reversión parcial hacia un epitelio normal inducido por la adriamicina en concentración  $10^{-7}$  M. Recientemente se demostró que esta línea celular es altamente heterogénea, con subpoblaciones con diferente grado de diferenciación (Resnicoff y col., 1987); y agentes que promueven o inhiben la diferenciación pueden afectar la heterogeneidad celular a través de la modificación de las proporciones relativas de cada subpoblación presente en esta línea celular (Resnicoff y col., 1989).

### 3. Metabolismo de hidroperoxidos en celulas de cultivo de melanoma maligno humano.

Se conoce desde hace varios años que niveles aumentados de las especies de oxígeno activo y los productos de las reacciones que generan se encuentran amenudo presentes en las celulas tumorales (Perchellet y col., 1989).

Se utilizo la linea tumoral IIB-Mel-J como modelo de celula melanotica con el objeto de estudiar el rol desempeñado por la molecula de melanina en el metabolismo de hidroperoxidos de este tipo celular. En primera instancia determinamos los niveles de las enzimas antioxidantes observandose que la Mn-superoxido dismutasa mitocondrial, la Cu-Zn-superoxido dismutasa citosolica, la Se-glutation peroxidasa y la no especifica glutacion peroxidasa no presentaron variacion durante la transicion de la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria. No obstante es interesante anotar que las celulas en fase estacionaria poseian niveles altos de melanina, presentaron niveles de Mn-superoxido dismutasa ( $0.47 \pm 0.06$  U/mg de proteina) menores que los de las celulas en fase exponencial ( $0.60 \pm 0.03$  U/mg de proteina) y menores que los obtenidos para celulas tumorales no melanoticas como las de tumor mamario MCF-7 ( $1.03 \pm 0.02$  U/mg de proteina) (Bustamante, y col., 1990). Esta observacion estaria de acuerdo con el hallazgo en higado de peces de que

el contenido de melanina se correlaciona inversamente con la actividad de la superoxido dismutasa mitocondrial (Sichel y col., 1987). A diferencia de la estabilidad de los niveles de las enzimas superoxido dismutasa y glutathion peroxidasa en las dos fases de crecimiento estudiadas, la enzima catalasa en las células en fase estacionaria presento una mayor actividad especifica ( $10.8 \pm 0.6$  U/mg de proteina) en comparacion con los valores obtenidos para las células en la fase exponencial ( $7.6 \pm 0.3$  U/mg de proteina). Los resultados anteriores explican directamente los niveles de peroxido de hidrogeno mas bajos ( $2.1 \pm 0.2$   $\mu$ M) encontrados en las células de las fase estacionaria en comparacion con los niveles de las células en fase exponencial ( $3.3 \pm 0.2$   $\mu$ M). Cuantitativamente el 40% de aumento en la actividad de catalasa es consistente con el 40% de disminucion en el contenido de peroxido de hidrogeno intracelular (asumiendo que las velocidades de produccion no se modifican) en las células de la fase estacionaria cuyo contenido de melanina fue mas alto. Esta diferente actividad de catalasa tambien puede explicar directamene la mayor resistencia al peroxido de hidrogeno generado extracelularmente a traves del sistema enzimatico glucosa-glucosa oxidasa presentada por las células de la fase estacionaria. Cuantitativamente tambien este 40% de aumento en la actividad de catalasa se encuentra correlacionado con el 60% de disminucion en la sensibilidad al peroxido de hidrogeno generado extracelularmente.

El hecho de que el mismo aumento en la actividad de catalasa se encuentre en el homogeneizado total (donde se encuentran los granulos de melanina) en comparacion con el citosol (el cual no posee los granulos de melanina) no sustenta la idea de que la melanina juegue un papel importante en el metabolismo del peroxido de hidrogeno. Sin embargo una actividad de peroxidasa presente en los granulos de melanina en los cuales los precursores o melaninas de bajo peso molecular actuarian como donadores de hidrogeno no puede descartarse en este momento. La concentracion intracelular de peroxido de hidrogeno en estado estacionario para las celulas de melanoma ( $2.1 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$ ) es del mismo orden de magnitud que el valor encontrado en las celulas de carcinoma de mama ( $1.38 \pm 0.21$ ), (Bustamante y col., 1990) y en las celulas de *Trypanosoma cruzi* ( $1.5 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ ) (Giulivi y col., 1988) y algo mayor que la concentracion medida en celulas de glomerulo ( $0.5 \pm 0.1$ ) y un orden de magnitud mayor que en hepatocitos ( $0.1$   $\mu\text{M}$ ) (Giulivi y col., 1988). Es interesante anotar que el aumento del 100% en quimioluminiscencia es consistente con el 50% de aumento en la concentracion del peroxido de hidrogeno intracelular. Esto ya que se ha observado una relacion casi lineal entre la quimioluminiscencia espontanea y el cuadrado de la concentracion intracelular de peroxido de hidrogeno en hepatocitos de higado de rata en un rango de  $0.1$  a  $0.4$   $\mu\text{M}$  (Giulivi y col., 1988; Giulivi, 1988). Los hallazgos obtenidos en este estudio podrian contribuir a explicar la



resistencia relativamente alta encontrada en las células de melanoma hacia la radioterapia, hacia la quimioterapia con antibióticos generadores de radicales libres y hacia el ataque inmunológico de los polimorfonucleares y macrófagos mediado a través de especies de oxígeno activo.

#### 4. Efectos de la melanina in vitro.

La melanina forma parte de los pigmentos mas frecuentes e importantes presentes en el reino animal y su funcion primaria es la fotoproteccion. Este pigmento presenta una serie de propiedades fisicoquimicas poco frecuentes en los polimeros biologicos; las melaninas son sustancias amorfas, poco solubles y con una gran capacidad de interaccionar con iones formando quelatos (Sarna y col., 1976), y de llevar a cabo procesos de oxido-reduccion (Gan y col., 1974). Las melaninas en estado purificado se pueden caracterizar por la presencia constante de radicales libres, probablemente semiquinonas, cuyas señales permiten su identificacion a traves de resonancia electronica paramagnetica (Sealy y col., 1980).

La biosintesis de estos pigmentos en los mamiferos se realiza en los melanosomas dentro de los melanocitos. La enzima responsable es la tirosinasa que actua sobre la tirosina y sus productos oxigenados, oxidandolos a quinonas las cuales se polimerizan para dar la melanina (Blois y col., 1971) que es luego transportada a los queratinocitos en donde ejerce su funcion protectora. Las preparaciones de melanina sintetica son de facil obtencion a partir de la oxidacion de dopa, catecol o de otros compuestos hidroxil-aromaticos. Las melaninas sinteticas y naturales son dificiles de caracterizar en terminos de estructura quimica

y de organizacion molecular. Los pesos moleculares de estos polimeros estan en el rango de 8000 a 45000 daltons.

TABLA 16

DEFENSAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICAS PRESENTES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

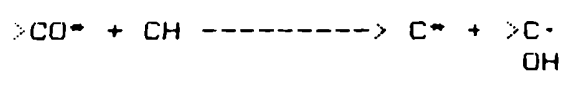
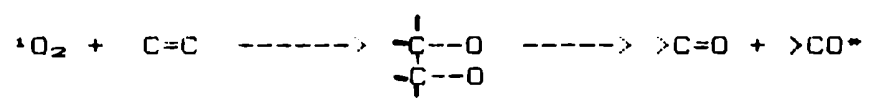
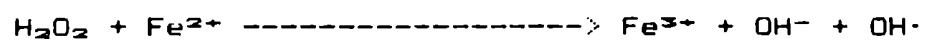
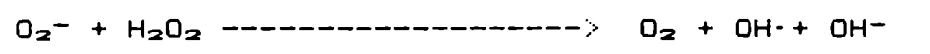
| SUSTANCIAS                   | FUNCION   |
|------------------------------|---|
| Tocoferoles (vitamina E)     | atrapador de $ROO\cdot RO\cdot$                         |
| Acido Ascorbico (vitamina C) | reductor  |
| Flavonoides (plantas)        |   |
| Carotenoides (vitamina A)    | atrapador de $^1O_2$                                    |
| Criptoxantina (plantas)      | "   |
| Crocina                      | "   |
| Bilirubina                   | "   |
| Biliverdina                  | "   |
| Acido Urico                  | "   |
|                              | $ROO\cdot OH\cdot$                                      |
|                              | a. hipocloroso  |
| Trolox (vit. C soluble)      | atrapador de $^1O_2 ROO\cdot RO\cdot$                   |
| Tioles                       |   |
| Cisteina                     | "   |
| Glutation                    | "   |
| Lipoato                      | "   |
| Metionina                    | "   |
| Manitol                      | atrapador de $OH\cdot$                                  |
| Glucosa                      | "   |
| Metalotioneina               | atrapa metales ( $Zn^{+2}$ $Cu^+$ $Cd^{+2}$ $Hg^{+2}$ ) |
| Proteinas-SH                 |   |
| Proteinas plasmaticas        |   |
| Ceruloplasmina               | $Fe^{+2} \text{ ----} \rightarrow Fe^{+3}$              |
| Haptoglobina                 | atrapa hemoglobina libre                                |
| Albumina                     | atrapa Cu   |
| Transferrina                 | atrapa Fe   |
| Nordihidroguaraiacético      | atrapador $OH\cdot$ , $R\cdot$ y $ROO\cdot$             |
| Glutation                    | atrapador $OH\cdot$ $^1O_2$                             |
| Melanina                     | atrapador de $O_2\cdot$ - otras funciones ?             |

Desde las observaciones hechas por Geremia y col. (1984) y por Siechel y col. (1987), quienes informaron la habilidad

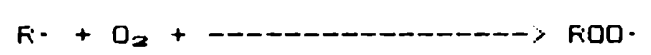
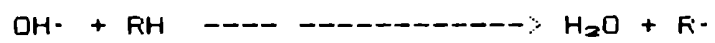
de preparaciones de melanina de diferente origen para atrapar  $O_2^{\cdot -}$  generado por el sistema xantina - xantina oxidasa y por el sistema  $KIO_4$  y  $H_2O_2$ , la melanina se incluye en la lista de los sistemas antioxidantes no enzimaticos conocidos en los sistemas biologicos (Tabla 16).

Las diferentes reacciones de radicales libres que ocurren en los sistemas biologicos y que llevan a los procesos de peroxidacion de los lipidos y de otras moleculas han sido dilucidados y establecidos en forma general (Chance y col., 1979). Las reacciones en cadena de radicales libres se originan con las reacciones de iniciacion, las que una vez producidas llevan a una serie de reacciones bimoleculares sucesivas, denominadas reacciones de propagacion y reacciones de terminacion. Las classicas etapas de iniciacion, propagacion y terminacion ocurririan en los sistemas biologicos principalmente segun el esquema siguiente:

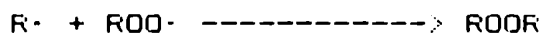
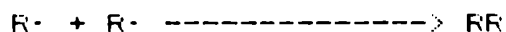
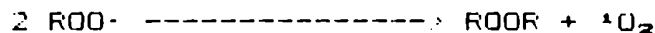
Reacciones de iniciacion:



Reacciones de propagacion :

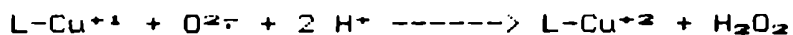
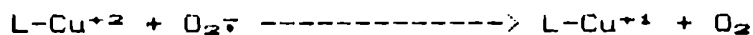
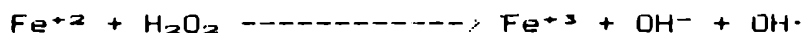
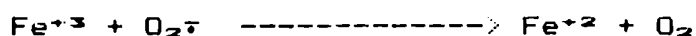


Reacciones de terminacion:



El grado de lipoperoxidacion de un sistema biologico se puede evaluar a traves de diferentes parametros como la produccion de sustancias reactivas al acido tiobarbiturico (TBARS), las que incluyen al malondialdehido principalmente y a otras sustancias; la determinacion del consumo de oxigeno en condiciones en que la unica reaccion es la de adicion de  $\text{R}\cdot \text{O}_2$ , la cuantificacion de dienos conjugados; la determinacion de la produccion de alcanos, como el etano, y el pentano y la determinacion de quimioluminiscencia.

En los proceso de lipoperoxidacion espontanea o endogena los iniciadores fisiologicos parecen ser radicales hidroxilos generados a partir de metales de transicion como Fe y eventualmente Cu que se encuentran complejados con proteina (hemoproteina) o con fosfatos organicos. En el caso del Fe las reacciones parecen ser las de Haber-Weiss y la de Fenton y se postulan ciclos similares para el caso del Cu.



Otras reacciones podrian generar radicales libres organicos en el homogeneizado, como por ejemplo el sistema F-450-monooxigenasa presente en el reticulo endoplasmico, el cual puede realizar una serie de reducciones de un solo electron durante la oxidacion de una gran cantidad de sustancias. Este y otros sistemas podrian contribuir a la generacion endogena de radicales libres los cuales generarian reacciones de iniciacion o centros de reaccion para producir lipoperoxidacion.

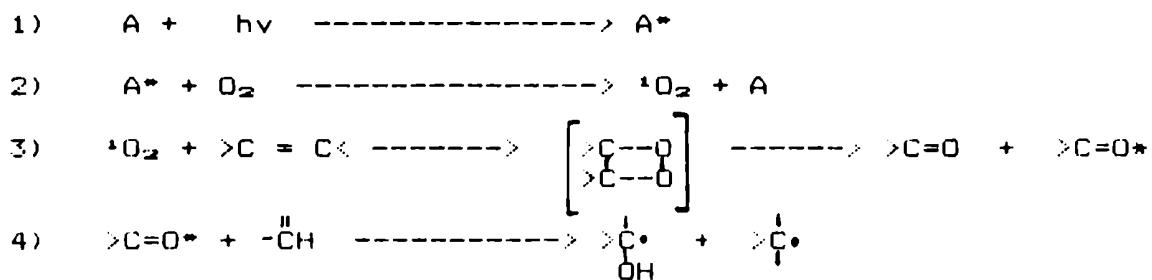
En este punto cabe considerar que un efecto antioxidante de la melanina debe entenderse en terminos de su capacidad de reaccionar con los intermediarios de la reaccion de radicales libres de la peroxidacion. En este contexto, la melanina deberia mostrar capacidad reactiva, cineticamente compatible con la accion biologica observada, con alguno o algunos de los siguientes intermediarios: a) anion superoxido ( $O_2^-$ ), hecho ya reportado por Siechel y col. (1987) (en este caso la melanina tendria actividad de superoxido dismutasa); b) peroxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) (en este caso la melanina tendria actividad de catalasa y/o de peroxidasa hecho tambien reportado por Aver'yanov y col. (1987); c) con radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ); d) con radicales alquilo ( $R\cdot$ ); e) con radicales hidroperoxilo ( $ROO\cdot$ ); o f) con oxigeno singulete ( $^1O_2$ ).

Observaciones sobre el hongo *P. orizae* mostraron que la melanina reducía el daño oxidativo ocasionado por el oxígeno singulete y por el radical superoxido sobre sus esporas,

inhibiendo su germinación (Aver;yanof y col., 1987)

Se ha observado también que la irradiación UV de muestras de cardiolipina genera la acumulación de hidroperóxidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y que la presencia de melanina posee un efecto inhibitorio de la generación de estas sustancias. Estos efectos inhibitorios podrían ser de gran importancia biológica en la estabilidad de las células que contienen este pigmento (ojos, piel, esporas de plantas, hígado y bazo de diferentes animales acuáticos), (Pustynnikof, 1987).

En diferentes sistemas biológicos se ha venido observando la capacidad protectora de la melanina contra el efecto de la radiación ultravioleta (Chedekel, 1982), en términos de inhibición de los procesos de lipoperoxidación, es decir mostrando efecto antioxidante en alguno de los siguientes pasos que pueden considerarse como claves para el efecto biológico de la irradiación visible, UV-a y UV-b. A significa aceptor (quinonas, nucleótidos, etc)



El propósito de estos experimentos consistió en determinar el efecto de preparados de melanina (sintética y tumoral)

en el proceso de lipoperoxidacion de un homogeneizado de higado de rata. Las reacciones de lipoperoxidacion estudiadas fueron la espontanea o endogena, en la cual no se utilizo ningun tipo de iniciador y las peroxidaciones iniciadas por hidroperoxido de tert-butilo y 2.2-bis (amidinopropano) hidrocioruro.

Las preparaciones de melanina sintetica no presentaron niveles detectables de  $Cu^{+2}$ , mientras que las preparaciones de melanina extraida de tumores melanoticos humanos presentaron una concentracion de cobre de  $339 \pm 2$  ng/mg de melanina. A diferencia de los tejidos normales algunos tumores contienen altas concentraciones de cobre (Carpentieri y col., 1985). Los melanomas equinos presentan niveles de cobre hasta 2-4 veces mayores que tejidos normales pigmentados. Los valores de cobre encontrados en metastasis de tumores melanoticos equinos fueron de  $3.5 \pm 0.4$  ug/g de peso humedo de tejido tumoral (Krauter y col., 1989). Parte de este cobre se encuentra asociado a las enzimas tirosinasa y superoxido dismutasa y alrededor del 90% se encuentra asociado a la melanina la cual posee como ya se dijo una alta capacidad de unir metales.

En los estudios realizados sobre la lipoperoxidacion espontanea de homogeneizados de higado de rata los resultados mostraron efectos similares en presencia de preparaciones de melanina sintetica y de melanina tumoral, observandose inhibiciones maximas del 90% y del 80% respectivamente. Este efecto podria deberse en principio

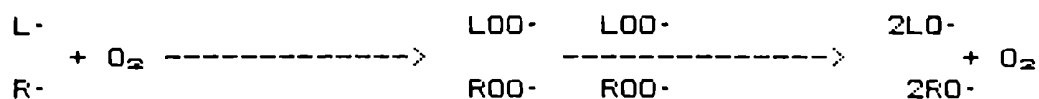
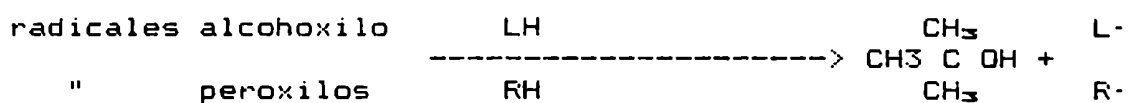
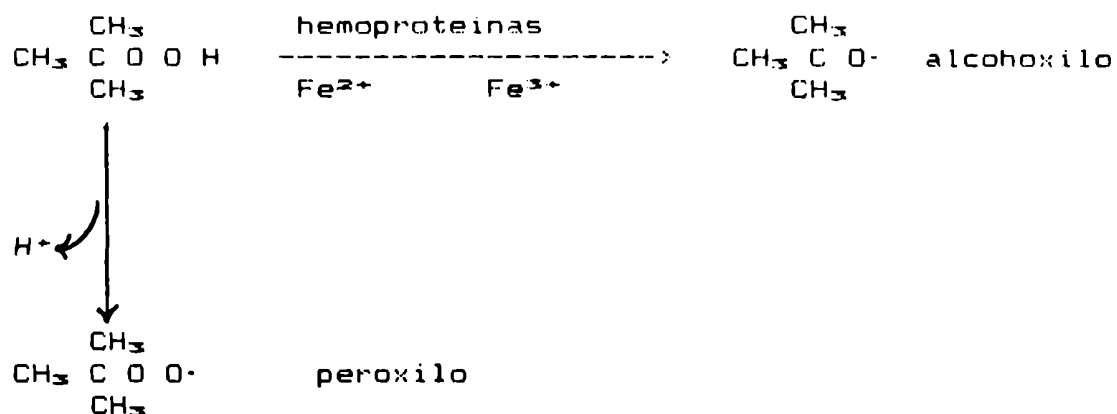


a dos causas principales a) la reaccion de la melanina con radicales libres y b) la quelacion de iones.

La melanina posee dado su caracter de molecula con electrones desapareados, es decir de radical libre, la capacidad de reaccionar con radicales dando un producto de adicion ( $Me\cdot + R\cdot \rightarrow Me-R$ ). Esta reaccion puede considerarse como una reaccion de adicion o como una reaccion de terminacion ya que se cancelan dos radicales libres o centros de reaccion. Las reacciones de adicion son muy rapidas con constantes de reaccion de  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Es por lo tanto de esperar que las reacciones de las melaninas con los radicales alquilo ( $R\cdot$ ) y peroxilo ( $ROO\cdot$ ) sean muy efectivas. La deslocalizacion del electron desapareado en practicamente toda la molecula hace que el valor de la seccion eficaz de reaccion para la melanina se acerque al valor de su superficie.

Las melaninas inhibieron la lipoperoxidacion endogena con valores de  $IC_{50}$  5.5 ug/mg de proteina y 2.5 ug/mg de proteina para la melanina tumoral y sintetica respectivamente. Este mayor efecto de la melanina sintetica correlaciona con la disminucion de los valores de la relacion  $[TBARS]/[O_2]$  en presencia de melanina sintetica (0.013%) y de melanina tumoral (0.034%).

El proceso de lipoperoxidacion iniciado por hidroperoxido de ter-butilo se inicia segun el esquema siguiente:



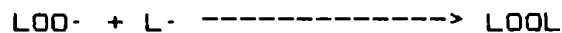
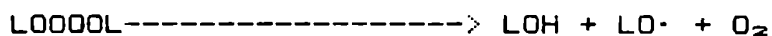
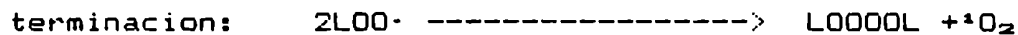
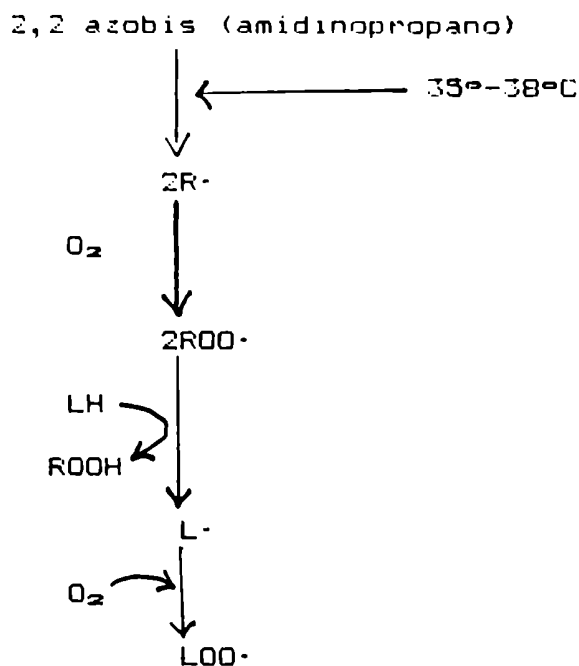
Los compuestos así generados debido a su gran reactividad producen reacciones de iniciación del proceso en cadena de lipoperoxidación. Es interesante señalar que el hidropéroxido de tert-butilo en concentraciones muy bajas (5-20  $\mu\text{M}$ ) no produce una lipoperoxidación cuantificable pero presenta una fuerte actividad carcinogénica específicamente como promotor y progresor tumoral. (Cerutti, 1985; Kensler, 1986). Aumentando el nivel de rupturas en el DNA y el nivel poli ADP-ribosilación de proteínas en diferentes líneas celulares (Muehlemitter y col., 1988), siendo además un potente inductor de la expresión del oncogene c-fos cuyo

efecto a nivel de la expresion de diferentes tipos de genes es conocido (Muehlematter y col., 1989).

La lipoperoxidacion iniciada por hidroperoxido de ter-butilo sobre homogeneizados de higado de rata mostro efectos diferentes de las preparaciones de melanina tumoral y sintetica (Fig 17). Hubo una inhibicion clara por parte de melanina sintetica siendo esta de 54% para una concentracion de melanina de 40 ug/mg de proteina. Por el contrario, las preparaciones de melanina tumoral no presentaron efecto sobre la lipoperoxidacion iniciada por hidroperoxido de ter-butilo. Tampoco se mostro ningun aumento de esta lipoperoxidacion a pesar del contenido de Cu de la melanina tumoral. La  $IC_{50}$  para la melanina sintetica fue de 30 ug/mg de proteina para este sistema.

Los valores de [TBARS]/[O<sub>2</sub>] para este sistema mostraron una clara inhibicion en presencia de melanina sintetica a medida que aumentaba su concentracion con respecto a los controles sin melanina y con la misma concentracion de melanina tumoral.

Tambien se utilizo el 2,2 azobis (amidinopropano) como iniciador del proceso de lipoperoxidacion, este compuesto no requiere la presencia de metales para su ruptura, por consiguiente la generacion de radicales, necesita solamente de temperatura (35-40° C). El proceso de lipoperoxidacion se inicia segun el esquema siguiente:



Como se observa en el esquema anterior la iniciacion del proceso no requiere la presencia de metales como catalizadores. Los resultados obtenidos para el proceso peroxidativo iniciado por el 2,2 azobis (amidinopropano) en presencia de las preparaciones de melanina sintetica y tumoral presentaron efectos similares para las dos melaninas con inhibiciones de 30% y 20% para la melanina sintetica y tumoral respectivamente. Siendo las IC<sub>50</sub> de 120 y 500 ug de melanina/mg de proteina respectivamente.

En la Tabla 17 se observan los resultados obtenidos con

las preparaciones de melanina en los diferentes sistemas de lipoperoxidacion. Los valores de  $IC_{50}$  para las preparaciones de melanina sintetica y tumoral obtenidos en los distintos procesos de lipoperoxidacion se encuentran agrupados en la Tabla 18.

TABLA 17

INHIBICION DE LOS PROCESOS DE LIPOPEROXIDACION POR  
PREPARACIONES DE MELANINA SINTETICA Y TUMORAL

| ADICIONES   | ESPONTANEA | INICIADORES                 |                                  |
|-------------|------------|-----------------------------|----------------------------------|
|             |            | HIDROPEROXIDO<br>TER-BUTILO | 2,2-BIS,AMIDINOPROPANO<br>(AAPH) |
| Ninguna     | 0          | 0                           | 0                                |
| M.Sintetica | 90%        | 54%                         | 30%                              |
| M.Tumoral   | 80%        | 0                           | 20%                              |

\*PREPARACION DE MELANINA SINTETICA (40UG/MG DE PROTEINA), \*\* PREPARACION DE MELANINA TUMORAL (40UG/MG DE PROTEINA).

El 2,2 azobis (amidinopropano) asi como otros compuestos es capaz de generar radicales libres los cuales pueden hacer blanco en diferentes moleculas de proteina, alterando ciertos grupos de la molecula a traves de un proceso oxidativo; dando como resultado en el caso de moleculas enzimaticas su inactivacion, aunque mucho menos probable que la situacion anterior es la activacion de enzimas o proteinas debido a la oxidacion de grupos tioles esenciales;

como en el caso de la PKC (Protein kinasa C) (Larsson y col., 1989), en la insulina en el transporte de glucosa, (Czech y col., 1974) y en el caso de la angiotensina, (Ikemoto y col., 1988).

En este caso se obtuvo la perdida del 50% de la actividad de la enzima glucosa oxidasa al tratarla con 2,2 azobis-(amidinopropano); ambas preparaciones de melaninas restablecieron la actividad de esta enzima mostrando un claro efecto protector contra los radicales libres generados por este compuesto. En este caso, la accion de proteccion identifica una actividad atrapadora de radicales libres tipo alquilo (R·) y peroxilo (ROO·).

TABLA 18

VALORES DE IC<sub>50</sub> OBTENIDOS PARA LAS PREPARACIONES DE MELANINA SINTETICA Y TUMORAL

| SISTEMAS                 | IC <sub>50</sub> (ug/ml) |                  |
|--------------------------|--------------------------|------------------|
|                          | MELANINA SINTETICA       | MELANINA TUMORAL |
| Espontanea               | 2.5                      | 5.5              |
| Hidroperoxido ter-butilo | 30                       | -                |
| 2,2,amidinoprpano        | 120                      | 500              |

LOS VALORES DE IC<sub>50</sub> SE REPORTAN COMO UG DE MELANINA/MG DE PROTEINA).

Los resultados obtenidos en la determinacion de la actividad de superoxido dismutasa presente en las dos preparaciones de

melanina mostro que 1 U SOD equivale a 0.15 ug de enzima/ml mientras que 1 U SOD corresponde a 100 ug de melanina; representando en las celulas de melanoma alrededor del 6% de la actividad total de superoxido dismutasa, lo cual estaria de acuerdo con las observaciones realizadas sobre la capacidad atrapadora de  $O_2^-$  presente en las preparaciones de melanina natural (Siechel y col., 1987). A diferencia de la presencia de esta actividad observada en preparaciones de melanina proveniente del hongo *Pyricularia oryzae* por Aver'yanov y col. (1987), no se encontro actividad de catalasa despues de tratamiento con azida y de tratamiento con HCl 6N y en las dos preparaciones de melanina.

## 5. Celulas de corteza adrenal de rata.

El proceso de peroxidacion derivado de un defectuoso metabolismo de los hidroperoxidos normalmente producidos constituye un problema para muchos tejidos. La glandula suprarenal parece particularmente susceptible, ya que tanto la corteza como la medula poseen niveles muy altos de oxigenasas y oxidasas que podrian generar radicales libres del oxigeno. La corteza suprarenal posee un alto contenido de citocromo P<sub>450</sub> y las interacciones entre este y los diferentes esteroides podria ser la fuente mayor de los productos de la reduccion parcial del oxigeno que lleva a una situacion prooxidante observada en este tejido. La celula de la corteza adrenal se encuentra protegida contra este proceso por altas contenidos en las defensas antioxidantes enzimaticas superoxido dismutasa catalasa y glutation peroxidasa y no enzimaticas como glutation, alfa-tocoferol, retinol, acido ascorbico y selenio, especificamente posee altos contenidos de acido ascorbico los cuales disminuyen rapidamente en condiciones de estres. Las celulas de la corteza se separan en tres zonas: glomerulosa, fasciculata y reticular estas pertenecen a un mismo tipo de celulas parenquimatosas las que presentan una migracion gradual desde la parte externa hasta la parte interna de la corteza. Se ha demostrado que existe una mayor mortalidad en las celulas de la parte interna (reticularis) y que las celulas de la parte externa (glomerulosa) serian



las mas jovenes, este tipo de migracion desde el nacimiento hasta la muerte constituye la historia de las celulas adrenales y se considera como un interesante caso de envejecimiento celular (Hornsby y col 1983, 1987). Estas observaciones se han realizado a traves de estudios con celulas de la corteza adrenal en cultivo en las cuales se observa una transformacion de las celulas de la zona glomerulosa en celulas de la zona fasciculata y reticular (Gill y col 1982), a traves del tiempo de cultivo o por acciion de diferentes agentes.

Las celulas suprarenales en cultivo se tornan deficientes en selenio (Hornsby y col., 1985) en vitamina E (Hornsby y col.,1985) y en acido ascorbico (Hornsby y col.,1985).

Consideramos que cultivos de estas celulas constituyen un sistema interesante para investigar el papel de estos antioxidantes biologicos en la proteccion contra el daño oxidativo.

Durante el proceso de disgregacion celular se agotan algunos de los antioxidantes no enzimaticos como el acido ascorbico y la vitamina E, agregar 1 uM de acido ascorbico durante el proceso de disgregacion de las celulas permite un mejor rendimiento de los cultivos.

Los valores obtenidos para las tres enzimas antioxidantes fueron mayores que los encontrados en las celulas tumorales como MCF-7 y IIB-MELJ siendo el doble para la superoxido dismutasa y aproximadamente 10 veces mas para la glutatión peroxidasa y para la catalasa.

El contenido de las enzimas superoxido dismutasa y catalasa no se vio mayormente afectado durante la disgregacion tisular y tampoco por la adiccion de 20 nM de selenito de sodio al medio de cultivo. Mientras que la enzima glutathion peroxidasa si se vio afectada por este tratamiento. Los niveles de esta enzima se vieron disminuidos en un 50% despues de varios dias de cultivo en ausencia de suero; es posible restablecer estos niveles despues de la adiccion de 20 nM de selenito de sodio, lo cual esta de acuerdo con los resultados reportados por Hornsby, 1985.

# CONCLUSIONES

1. La Ausencia de suero en el medio de cultivo produce una disminucion de los niveles de la enzima glutation peroxidasa, pero no afecta la proliferacion celular, tanto en cultivos de celulas tumorales como en cultivos primarios de celulas normales de adrenal de rata.

2. La presencia de concentraciones de  $\text{SeO}_3\text{Na}_2$  (20nM) produce un efecto inhibitorio del crecimiento de las celulas tumorales de carcinoma de mama humano (MCF-7).

3. Niveles de  $\text{SeO}_3\text{Na}_2$  de 20 nM presentes en el medio de cultivo de celulas normales de adrenal de rata no muestran efectos inhibitorios de la proliferacion celular y restituyen los niveles de glutation peroxidasa, disminuidos por el crecimiento de estas celulas en ausencia de suero.

4. La adriamicina inhibe la proliferacion celular, generando un estres oxidativo caracterizado por aumentos en: a) el consumo de oxigeno, b) los niveles intracelulares de peroxido de hidrogeno en estado estacionario, y c) en la produccion de sustancias que reaccionan con acido tiobarbiturico.

4. El aumento en quimioluminiscencia estuvo asociado a un aumento paralelo de los niveles de peroxido de hidrogeno en el estado estacionario en los dos sistemas de celulas tumorales estudiadas, (MCF-7 e IIB-Mel-J).

5. Las células de melanoma con mayor concentración de melanina (11.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) presentan una menor concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular, una menor quimioluminiscencia, así como una mayor resistencia a un flujo de peróxido de hidrógeno extracelular; todo esto se asocia a un aumento en los niveles de catalasa, más que a los niveles de melanina presentes en estas células.

6. Preparaciones de melanina sintética y de melanina provenientes de tumores son capaces de inhibir la lipoperoxidación espontánea en homogeneizados de hígado de rata. Preparaciones de melanina tumoral también lo hacen aunque con menor eficiencia.

7. Preparaciones de melanina sintética inhiben la lipoperoxidación iniciada por hidroperóxido de *ter*-butilo, mientras que las preparaciones de melanina tumoral no tuvieron efecto.

8. Preparaciones de melanina sintética y tumoral son capaces de inhibir la lipoperoxidación iniciada por 2,2bis-amidinopropano (AAPH).

9. Las dos preparaciones de melanina sintética y tumoral son capaces de proteger la enzima glucosa oxidasa de la inactivación del 50% debida a la producción de radicales libres por parte del 2,2azo,bis-amidinopropano.

# BIBLIOGRAFIA

Amstad, F. y Cerutti, F. (1990) Genetic modulation of the cellular antioxidant defense Capacity. Environmental Health Perspectives. vol: 88, 77-82.

Apffel, C.A. (1972) Deactivation of tumor cells by blocking of sulfhydryls. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 13: 1-9.

Asada, K. y Kanamatsu, S. (1976) Reactivity of thiols with superoxide radicals. Agricul. Biol. Chem. 40: 1891-1897.

Asakawa, T. y Matsushita, S. (1982) Thiobarbituric acid test of detecting lipid hydroperoxides under anaerobic conditions. Agric. Biol. Chem. 45: 453-457.

Aver'yanov, A.A., Lapikova, V., Petelina, G., Dzhavakhiya, V., y Stekol'shchikov, M. (1987) Influence of melanin on the cytotoxicity of oxygen radicals. Traducido de Biokhimiya. 52: 1539-1546.

Bachur, N.R., Gordon, S.L. y Gee M. V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. Cancer Res. 38: 1745-1750.

Badwey, J. y Karnovsky, M. (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann. Rev. Biochem. 49: 695-726.

Bates, D. y Winterbourn, C.C. (1982) Deoxiribose breakdown by the Adriamycin semiquinone and  $H_2O_2$ : evidence for hydroxyl radical participation. FEBS Lett 145: 137-142.

Batist, G., Norton, J., Katki, A.G., Wagman, L., Ferrans, V.J., Maher, M. and Myers, C.E. (1985) Cardiac and red blood cell glutathione peroxidase: results of a prospective randomized trial in patients on total parenteral nutrition. Cancer Res. 45: 5900-5903.

Batist, G., Katki, A.G., Klecker, R. and Myers, Ch. (1986) Selenium-induced cytotoxicity of human leukemia cells: Interaction with reduced glutation. Cancer Res, 46: 5482-5485.

Beauchamp C.O. y Fridovich I. (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ, Biochim. Biophys. Acta, 317: 50-58.

Beaudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. y De Duve, C. (1964), Tissue Fractionation Studies Biochem. J. 92: 179-183.

Beers R., Sizer I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195: 133-141.

Bert, F. (1978) En: Barometric Pressure Research in experimental Pathology. Traducido por Hitchcock M.A. y Hitchcock F.A.. College Book Co.. Columbus . Ohio.

Blois, M. (1971) Biology of the normal and abnormal melanocytes, (Kawamura, T., Fitzpatrick, B. and Seiji, M. eds), p. 125.

Boveris, A., Varsavsky, A., Goncalves Da Silva, S. y Rodolfo, A. (1983) Chemiluminescence of soybean seeds: spectral analysis, Temperature dependence and effect of inhibitors. Photochem. Photobiol. 38: 99-104.

Boveris, A., Fraga, C., Varsavsky, A. y Koch, D.R. (1983) Increased Chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. Arch. Biochem. Biophys. 227: 534-541.

Bozzi, A., Mavelli, I., Finazzi, A., Stram, R., Wolf, A., Modovi, B. y Rotilio, T. (1976) Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. II. Erythrocytes and tumoral cells. Mol. Cell. Biochem. 10: 11-16.

Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978) Biological oxidation, microsomal, cytochrome P-450 and other hemoprotein systems. Meth Enzymol. 52: 302-310.

Burton, G.W. y Ingold, K.U. (1984) B-Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. Science 224: 569-573.

Bustamante, J., Galeano, M., Medrano, E. y Boveris, A. (1990) Adriamycin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells. Breast Cancer Res. Treat. 17: 145-153.

Cantoni, D., Sestili, F., Cattabeni, F., Bellomo, G., Fou, S., Cohen, M. y Cerutti, P. (1989) Calcium chelator Quin 2 prevents hydrogen-peroxide-induced DNA breakage and cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 182: 209-212.

Carpentieri, U., Myers, J., Thorpe, L., Daeschner, C.W. y Haaggard, M. E. (1986) Cancer Res. 46: 981-984.

Cerutti, P. (1985) Prooxidant states and tumor promotion . Science 227: 375-381.

Cerutti, P., Larsson, R., Krupitza, G., Muehlemaetter, D., Crawford, D., y Amstad, F. (1989) Pathophysiological mechanisms of active oxygen . Mutation Res. 214: 81-88.

Cerutti, P. y Trump, Benjamin F. (1991) Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. Cancer Cells. 8: 34-45.



- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. (1979) Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-602.
- Chedekel, M. (1982) Photochemistry and Photobiology of epidermal melanins. *Photochem. Photobiol.* 35: 881-885.
- Cross, C. E., Watanabe, T.T., Hasegawa, G.K., Goralnif, G., Roertgen, K.E., Kaisu, T., Reiser, K.M., Gorin, A.B. (1979) Biochemical assays in lung homogenates: artifacts caused by trapped blood after perfusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48: 99-109.
- Czech, M., Lawrence, J.C. jr, y Lynn, W.S. (1974) Evidence for involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insuline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 4173-4177.
- Davies, K.J.A. (1986) Oxidative stress cause protein degradation and lipid peroxidation by different mechanism in red blood cells. In lipid peroxidation in biological systems. American Oil Chemists' society, Illinois 100-116.
- Davies K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9899.
- De Duve, C. y Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev* 46: 323-357.
- Dejours, F. (1977) En: Oxygen and Physiological Function, Ed: F.F. Jobsis (Professional Information. Library, Dallas) pp 1-12.
- Del Rio L., Gomez Ortega, M., Leal lopez, A. y Lopez Gorge J.A. (1977), A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Analyt. Biochem.* 80: 409-415.
- Di Marco, A. (1975) Adriamycin (NSC-123127): Mode and mechanism of action. *Cancer Chemother. Rep* 6: 91-94.
- Di Marco, A. En *Cancer Medicine* Holland, J.F., Frei, E. (eds) . Lea y Febiger, Philadelphia, (1982), pp 872-906.
- Di Mascio, F., Devasagayam, T., Kaiser, S., y Sies, H. (1990) Carotenoids, tocopherols and thiols as biological siglet molecular oxygen quenchers. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 1054-1056.
- Dionisi, D., Galeoti, T., Terranova, T. y Azzi A. (1975) Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normals and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 403: 292-300.
- Doroshov, J. (1983) Effect on antracycline antibiotics on

oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 43: 460-472.

Estabrook, R.W. (1967) Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Meth. Enzymol* vol X pp 41-47.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M., Foli, G. y Slater, T. (1982) Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem. J.* 208: 199-207.

Flohe, L. (1982) Role of GSH peroxidase in lipid peroxide metabolism. In: *Lipid peroxides in Biology and Medicine*. Ed. K. Yagi Academic Press N.Y. pp 149-159.

Fraga, C.G., Llesuy, S.F., Koch, O.R. y Boveris, A. (1985) In situ liver chemiluminescence under physiological conditions and situations of oxidative stress. *Acta Medica Romana.* 23: 261-274.

Fraga, C.G., Shigenaga, M., Park, J.W., Degan, P. y Ames, B. (1990) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4533-4537.

Friedman, D.L. (1976) Role of cyclic nucleotides of cell growth and differentiation. *Physiol. Rev.*, 56: 652-708.

Gan, E.V., Haberman, H.F. y Menon, I.A. (1974) Oxidation of NADH by melanin and melanoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 370: 62-69.

Ganther, H.E., Hafeman, D.G., Lawrence, R.A., Serfass, R.E., y Hoekstra, W.G. (1976) Selenium and glutathione peroxidase in health and disease. En *Trace elements in human health and disease*, A.S. Prasa (ed.), New York: Academic Press. Inc pp 165-234.

Geremia, E., Corsaro, C., Bonomo, R., Giardinelli, R., Pappalardo, P., Vanella, A y Siechel, G. (1989) Antioxidant enzymatic systems in pigment tissues of Amphibia. *Pigment Cell Res.* 2: 208-212.

Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, F., Dwyer, P., Fenw, W.V. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science* 119: 623-626.

Giulivi, C., Turrens J.F., Boveris, A. (1988) Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30: 243-252.

Giulivi, C. (1988) Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y

Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. pp 169-172.

Gill, G.N., Crivello, J.F. y Hornsby, F.J. (1982) Growth, function and development of the adrenal cortex: Insights from cell culture. Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation. 9: 461-481.

Gonzales Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A. (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. Free Radical Biol Med, 10: 93-100.

Gonzales Flecha, B., Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1991, pp 68-79.

Guerra, L., Mordoh, J., Slavutsky, I., Larripa, I., and Medrano, E. (1989) Characterization of IIB-Mel-J: A new and highly heterogeneous human melanoma cell line. Pigment Cell Res. 2: 504-509.

Gunzler, W., Kremers, A. y Flohe, L. (1974) An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem, 12: 444-448.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. (1989) En: Free Radicals in Biology and Medicine. (Oxford University Press) pp 416.

Hornsby, P., Harris, S. y Aldern, K. (1985) The role of ascorbic acid in the function of the adrenal cortex: studies in adrenocortical cells in culture. Endocrinol. 117: 1264-1271.

Hornsby, P., Pearson, D., Autor, A., Aldern, K. y Harris, S. (1985) Selenium deficiency in cultured adrenocortical cells: restoration of glutathione peroxidase and resistance to hydroperoxides on addition of selenium. J. Cell. Physiol. 123: 33-38.

Hornsby, P.J. y Crivello, J.F. (1983) The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. Mol. Cell. Endocrinol. 30: 123-147.

Hornby, F.J., O'Hare, M.J. and Neville, M. (1971) Functional and morphological Observations on rat adrenal zona glomerulosa cells in monolayer culture. Endocrinology 95: 1240-1251.

Ikemoto, F., Song, G.B., Tominaga, M. y Yamamoto, K. (1988) Oxidation-induced increase in activity of angiotensin converting enzyme in rat kidney. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1032-1037.

Krauter, B., Nagel, W., Hartmann, H. y Weser, U. (1989) Copper-thionein in melanoma. Biochim. Biophys Acta. 1013:

212-217.

Kensler, T.W. y Taffe, B.G. (1986) Free radicals in tumor promotion. *Adv. Free Radicals Biol. Med.* 2: 347-352.

Klug, H.L., Moxon, A.L., Petersen, D.F. y Painter, E.P. (1953) Inhibition of rat liver succinic dehydrogenase by selenium compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 108: 437-441.

Krupitza, G. y Cerutti, P. (1989) Poly(ADP-ribosilation) of histones in intact human keratinocytes. *Biochemistry* 28: 4054-4060.

Kellog, E.W., y Fridovich I. (1975) Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xantine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250: 8812-8817.

Lavoisier, A. L. (1783) *Memoires de Medicine et de Physique Medicale*. Vol 5 Paris, Soc Roy de Medicine, p 569.

Larsson, R. y Cerutti, P. (1989) Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C (CPK) following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res.* 49: 5627-5632.

Lankin, U.Z. y Gurevich, S.M. (1976) Inhibition of the peroxidation of lipids and detoxification of lipoperoxides by protective enzymes (Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase; in experimental malignant growth. *Dokl. Akad. Nauk SSS. R.* 226: 705-708

Lerner, A.B. (1955) *Meth Enzymol.* 2: 827-831.

Lloyd, D., Boveris, A., Reiter, R., Filipkowski, M. y Chance, B. (1979) Chemiluminescence of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem. J.* 184: 149-156.

Lowry, O.H., Rosebrought, N.H., Farr, A.L. y Randall, R.L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265-275.

McCord, J.M. and Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemo-cuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

Marklund, S.L., Westman, N., Lundgren, E., Ross, G. (1982) Copper and zinc-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42: 1955-1961.

Muehlematter, D., Larsson, R. y Cerutti, P. (1988) Active oxygen induced DNA strand breakage and poly ADP-ribosilation in promotable and non promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis.* 9: 239-244.

- Mimmaugh, E.G., Dusne, L., Atwell, J. y Myers, E.C. (1989) Differential oxygen radical susceptibility of Adriamycin-sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells. *Cancer Res.* 49: 8-15.
- Myers, Ch., Mc Guire, W.F., Liss, R.A., Ifrim, I., Grotzynger, D. y Young, R.C. (1977) Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 197: 165-167.
- McCord, J.M. y Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol Chem*, 244: 6049-6055.
- Meykens, F. L. y Fuller B.B. (1980) Characterization of the effects of different retinoids on the growth and differentiation of a human melanoma cell line and selected subclones. *Cancer Res*, 40: 2194-2196.
- Misra, H.P. y Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.
- Mittal, C. K. y Murad, F. (1977) Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4360-4364.
- Muehlemaetter, D., Takafumi, O. y Cerutti, P. (1989) Effects of tert-butyl hydroperoxide on promotable and non-Promotable JB6 mouse epidermal cells. *Chem.-Biol. Interactions* 71: 339-352.
- Mello Filho, A.C., Hofmann, M.E. y Meneghini, R. (1984) Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* 218: 273-275.
- Oberlay, L.W., Bizi, I.B., Sahu, S.K., Leuthauser, S. y Gruber, H.E. (1978) Superoxide dismutase activity of normal murine liver, regenerating liver and H6 hepatoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 375-379.
- Oberlay, L.W., Sahu, S.K. y Cheng, F. (1978) Superoxide dismutase activity in normal mouse brain, prenatal brain, neuroblastoma cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 19: 147-151.
- Ochi, T. y Cerutti, P. (1987) Clastogenic action of hydroperoxy-5,8,11,13,-icosatetraenoic acids on the mouse embryo fibroblast C3H/10T/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 990-994.

(1987) Relationship between melanine content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell. Biochem. Function.* 5: 123-128.

Seitz R. (1978), Chemiluminescence detection of enzymatically generated peroxide. *Methods Enzymol.* 57: 445-463.

Slater, T.P. y Sawyer B.C. (1971) The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogeno-alkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. *Biochem J.* 123: 805-814.

Thayer, W.S. (1977) Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles. *Chem. Biol. Interac* 19: 265-272.

Turrens, J.F., Giulivi, C. y Boveris, A. (1986) Increased spontaneous chemiluminescence from liver homogenates and isolated hepatocytes upon inhibition of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  utilization. *J. Free Rad. Biol. Med.* 2: 135-140.

Turro, N.J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry.* The Benjamin/Cummings. Menlo Park. California. pp 362-378.

Tyler, D.D. (1975) Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.* 147: 493-504.

Yamanaka, N.Y. y Deamer, D. (1974) Superoxide dismutase activity in W138 cell cultures. Effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. *Physiol. Chem. Phys.* 6: 95-106.

Yamamoto, Y., Niki, E., Eguchi, J., Kamiya, Y. y Shimasaki, H. (1985) Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochim. Biophys. Acta.* 819: 29-36.